

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Impact du parasite *Leishmania donovani* sur les réponses à l'IFN- γ
et la signalisation via la voie JAK-STAT1**

Par
Christine Matte

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc) en
Virologie et Immunologie

Jury d'évaluation

Président du Jury **Denis Girard, INRS-Institut Armand-Frappier**

Examinateur externe **Florence Dzierszinski, Université McGill**

Directeur de recherche **Albert Descoteaux, INRS-Institut Armand-Frappier**

SOMMAIRE

Afin d'empêcher leur reconnaissance par le système immunitaire adaptatif ainsi que leur destruction par le macrophage, les parasites protozoaires du genre *Leishmania* doivent à tout prix éviter l'activation des mécanismes antimicrobiens du macrophage. Le stade promastigote de diverses espèces de *Leishmania*, notamment *L. donovani*, est reconnu pour inhiber les réponses à l'interféron (IFN)- γ chez le macrophage en interférant avec la signalisation via la cascade des *Janus* kinases (JAK) et du transducteur de signal et activateur de transcription (STAT) 1. L'impact du stade amastigote sur l'activation des fonctions microbicides du macrophage par l'IFN- γ a toutefois peu été étudié. Ces connaissances sont nécessaires au développement de nouveaux traitements contre la leishmaniose, étant donné le rôle primordial du stade amastigote dans la progression de la maladie et dans l'induction de la pathologie.

Au cours de ce projet de recherche, nous avons entrepris de mieux caractériser les mécanismes d'évasion de l'activation du macrophage en réponse à l'IFN- γ par le stade amastigote de l'espèce *L. donovani*. Afin de répondre à cet objectif, nous avons analysé l'impact de l'infection de macrophages de moëlle osseuse (BMM) murins par des amastigotes de *L. donovani* sur les événements de transcription et de signalisation via la cascade JAK-STAT1 induits par l'IFN- γ . Nos résultats indiquent que le stade amastigote de *L. donovani* inhibe l'expression du facteur régulateur de l'IFN (IRF)-1 en réponse à l'IFN- γ , et par conséquent la transcription de gènes impliqués dans la présentation antigénique via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et dans la production d'oxyde nitrique (NO). Nous démontrons que ces effets ne découlent pas d'un défaut au niveau de l'activation de STAT1 α ni de la stimulation de régulateurs négatifs de la voie JAK-STAT1. Les amastigotes de *L. donovani* interfèrent plutôt avec la translocation de STAT1 α au noyau en réponse à l'IFN- γ en bloquant son interaction avec l'importine- $\alpha 5$, une protéine adaptatrice de transport nucléaire. Enfin, nous avons observé que l'inhibition des réponses à l'IFN- γ par le stade amastigote de *L. donovani* requiert un contact direct avec le parasite mais semble indépendant de sa viabilité.

Somme toute, cette étude met en évidence un nouveau mécanisme d'évasion de l'activation des fonctions antimicrobiennes du macrophage en réponse à l'IFN- γ par *L. donovani* et contribue à la compréhension des stratégies exploitées par *Leishmania* pour assurer sa survie intracellulaire.

Christine Malle

Étudiante

Adri

Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à offrir mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, Albert Descoteaux, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis de vivre une expérience de recherche des plus enrichissantes et stimulantes, et dont je garderai de précieux souvenirs. Sa confiance en moi, ses conseils judicieux et son support inconditionnel ont su me guider dans mon cheminement scientifique et personnel.

Qu'auraient été ces dernières années sans mes chers collègues et la merveilleuse ambiance qu'ils ont créée au laboratoire. Je n'oublierai jamais l'interminable patience d'Adrien, l'écoute et la compréhension de Christelle, ainsi que leurs remarques sur mon présumé 'caractère de québécoise'. Je me souviendrai toujours des discussions philosophiques avec Tamsir, de la chaleur et de l'humour de PO, des moments de folie avec Stéphanie et Christine, de l'éternel optimisme de Lydie, de la douceur de Carolina ainsi que de la candeur de notre très chère Neda. Je tiens aussi à saluer les autres membres du laboratoire passés et présents, notamment Robert, Jean-Fred, Julia et Guillermo, de même que les nombreuses personnes de l'institut que j'ai eu le bonheur de côtoyer, particulièrement Ronan et ses soirées inoubliables, Alexandre et sa joie de vivre contagieuse, Audrey, Héctor, Caroline, Benoît, et j'en passe... .

Je suis également éternellement reconnaissante pour l'amour, le soutien et les encouragements incessants de ma famille (la petite et la grande, je vous ADORE!), de mes sœurs d'adoption Nene et Jo, et de mes amis McGillois. Votre foi absolue en moi et votre affection m'ont permis de passer à travers certains moments plutôt difficiles.

MERCI!!!

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	II
REMERCIEMENTS	V
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	VIII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	IX
INTRODUCTION	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1. MACROPHAGE	5
2. INTERFÉRON	5
2.1. Classification.....	5
2.2. Effets cellulaires de l'IFN- γ	6
2.2.1. <i>Production de radicaux intermédiaires oxygénés et nitrogénés</i>	8
2.2.2. <i>Présentation antigénique via le CMH II</i>	8
2.3. Signalisation de l'IFN- γ	9
2.3.1. <i>Récepteur</i>	10
2.3.2. <i>JAK</i>	11
2.3.3. <i>STAT</i>	12
2.3.4. <i>Les facteurs régulateurs de l'IFN (IRFs)</i>	14
2.3.5. <i>Transduction du signal via la cascade JAK-STAT1</i>	15
2.3.6. <i>Translocation nucléaire de STAT1</i>	18
2.3.6.1. <i>Les importines</i>	18
2.3.6.2. <i>Import nucléaire de STAT1 par l'importine-$\alpha 5$</i>	19
2.3.7. <i>Inactivation et export nucléaire de STAT1</i>	21
2.3.8. <i>Régulation négative de la voie JAK-STAT1</i>	21
2.4. Modulation de la cascade JAK-STAT1 par des agents pathogènes.....	22
3. LEISHMANIA	23
3.1. Leishmanioses	24
3.1.1. <i>Formes cliniques</i>	24
3.1.2. <i>Diagnostic et traitement</i>	25
3.2. Cycle de vie	27
4. INTERACTIONS LEISHMANIA-MACROPHAGE.....	29
4.1. Modulation de la biogenèse du phagolysosome.....	30
4.2. Inhibition des fonctions antimicrobiennes du macrophage.....	30
4.2.1. <i>Suppression de la production de RNI et ROI</i>	30
4.2.2. <i>Blocage de la présentation antigénique via le CMH II</i>	31
4.2.3. <i>Modulation de la production de cytokines</i>	31

4.3. Inhibition de la réponse à l'IFN- γ	32
4.3.1. <i>Suppression de l'expression génique induite par l'IFN-γ.</i>	32
4.3.2. <i>Inhibition de la signalisation de l'IFN-γ via la voie JAK-STAT1</i>	32
ARTICLE	35
DISCUSSION	66
CONCLUSION	80
APPENDICE A	82
APPENDICE B	85
APPENDICE C	87
RÉFÉRENCES	89

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Structure générale des sous-unités du récepteur à l'IFN- γ	11
Figure 2 : Structure fonctionnelle et tridimensionnelle de STAT1.....	14
Figure 3 : Activation de la cascade JAK-STAT1 et de l'expression du CMH de classe II par l'IFN- γ	17
Figure 4 : Transport nucléocytoplasmique de STAT1 induit par l'IFN- γ	20
Figure 5 : Classification des principales espèces de <i>Leishmania</i>	24
Figure 6 : Cycle de vie de <i>Leishmania</i>	28
Tableau 1 : Exemples de gènes et de fonctions cellulaires stimulés par l'IFN- γ	7
Tableau 2 : Modulation de la voie JAK-STAT1 par les microbes intracellulaires.....	23

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- ADN** : Acide déoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARM : Motif de type armadillo
ARN : Acide ribonucléique
BMM : Macrophage dérivé de la moëlle osseuse
CAS : Susceptibilité cellulaire à l'apoptose
CBP : Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
CDK : Kinase cycline-dépendante
CIITA : Transactivateur de classe II
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CR : Récepteur du complément
CRM1 : « Chromosome region maintenance 1 »
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
dsNLS : NLS spécifique aux dimères
EF-1 α : Facteur d'elongation-1 α
EMSA : Technique de retard sur gel
FcR : Récepteur du fragment Fc des Ig
GAF : Facteur d'activation de l'IFN- γ
GAS : Séquence activée par l'IFN- γ
GIPL : Phospholipide glycoinositol
GTP : Guanosine triphosphate
GTPase : Guanosine triphosphatase
HLA : Antigène des leukocytes humains
HPRT : Hypoxanthine phosphoribosyl transférase
IFN : Interféron

IFNAR ou IFN α R: Récepteur à l'IFN- α/β

IFNLR : Récepteur à l'IFN- λ

IFNGR ou IFN γ R : Récepteur à l'IFN- γ

IgG : Immunoglobuline G

Ii : Chaîne invariante

IL : Interleukine

iNOS : Synthétase d'oxyde nitrique inducible

IRF : Facteur régulateur de l'IFN

IRF-E : Élément de liaison aux IRF

ISG : Gène stimulé par l'IFN- γ

ISRE : Élément de réponse stimulé par l'IFN

JAK : *Janus* kinase; Juste une autre kinase

JNK : Protéine kinase c-Jun N-terminale

JH : Domaine d'homologie à JAK

LPG : Lipophosphoglycan

LPS : Lipopolysaccharide

MAPK : Protéine kinase activée par les facteurs mitogènes

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NES : Signal d'export nucléaire

NF- κ B : Facteur nucléaire- κ B

NK : « Natural killer » cells

NLS : Signal de localisation nucléaire

NO : Oxyde nitrique

ORF : Cadre de lecture

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMP : Motif moléculaire associé à un pathogène

PIAS : Protéine inhibitrice des STATs activés

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PKC : Protéine kinase C

PKDL : Leishmaniose dermique post-kala-azar

PPG : Protéophosphoglycan

PTK : Protéine tyrosine kinase

PTP : Protéine tyrosine phosphatase

qPCR : PCR quantitatif en temps réel

RNI : Réactif intermédiaire nitrogéné

ROI : Réactif intermédiaire oxygéné

RSV : Virus syncytial respiratoire

RT : Retrotranscription

SHP : Protéine tyrosine phosphatase contenant un domaine 2 d'homologie à Src

SOCS : Supresseur de signalisation des cytokines

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription

TD : Domaine de transactivation

TGF- β : Facteur de croissance transformant- β

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale- α

TNFR : Récepteur du TNF- α

USF-1 : « Upstream stimulatory factor-1 »

VIH : Virus de l'immunodéficience humain

VP24 : Protéine vacuolaire 24

INTRODUCTION

Les parasites protozoaires du genre *Leishmania* sont les agents étiologiques de la leishmaniose, une maladie causant énormément de mortalité et de morbidité à travers le monde. Chez le mammifère, ces organismes intracellulaires infectent principalement le macrophage et leur survie repose donc sur la prévention de leur reconnaissance par le système immunitaire adaptatif et l'activation subséquente des mécanismes antimicrobiens du macrophage. Une des principales stratégies employées par *Leishmania* afin d'assurer sa survie intracellulaire consiste à perturber les diverses voies de signalisation modulant la présentation antigénique et les propriétés microbicides du macrophage, notamment la production de radicaux intermédiaires oxygénés et nitrogénés (Olivier, Gregory et Forget 2005; Kima 2007). Plusieurs espèces de *Leishmania*, incluant *L. donovani*, empêchent l'activation du macrophage par l'IFN- γ , par exemple, en interférant avec la transduction du signal via la cascade JAK-STAT1 (Nandan et Reiner 1995; Blanchette *et al.* 1999; Ray *et al.* 2000; Bhardwaj *et al.* 2005; Forget, Gregory et Olivier 2005; Xin, Li et Soong 2008).

Le stade promastigote de *L. donovani*, agent causal de la leishmaniose viscérale, est reconnu pour réguler négativement l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IFN- γ , empêcher la phosphorylation de JAK2, engendrer la dégradation de STAT1 α et stimuler l'activité des tyrosine phosphatases du macrophage (Blanchette *et al.* 1999; Ray *et al.* 2000; Nandan *et al.* 2002; Forget, Gregory et Olivier 2005; Nandan et Reiner 2005; Forget *et al.* 2006). Nos connaissances sur les mécanismes d'évasion de l'activation des fonctions microbicides du macrophage en réponse à l'IFN- γ par les amastigotes de *L. donovani* sont en revanche très limitées. Étant donné le rôle du stade amastigote dans la progression de la maladie et l'induction de la pathologie, l'approfondissement de ces connaissances est essentiel au développement de nouveaux traitements prophylactiques ou thérapeutiques contre la leishmaniose viscérale. L'objectif global du présent projet de recherche était donc d'éclaircir les mécanismes moléculaires par lesquels le parasite *L. donovani* interfère avec l'activation du macrophage par l'IFN- γ . Pour ce faire, nous avons entrepris de répondre aux objectifs spécifiques suivants :

- I. Vérifier l'impact des amastigotes de *L. donovani* sur la transcription de gènes impliqués dans la présentation antigénique via le CMH II et la production de NO.

- II. Analyser l'effet du stade amastigote de *L. donovani* sur la signalisation via la voie JAK-STAT1 en réponse à l'IFN- γ .
- III. Comparer les conséquences d'une infection par les amastigotes de *L. donovani* sur les réponses du macrophage à l'IFN- γ à celles d'une infection par le stade promastigote.

Le corps de cette dissertation débutera par une revue de la littérature concernant les principaux thèmes abordés dans le cadre de ce projet de recherche, soit le macrophage, son activation par l'IFN- γ , le parasite *Leishmania* ainsi que l'impact de ce dernier sur les fonctions antimicrobiennes du macrophage et leur induction par l'IFN- γ . Notons que dans la deuxième section de cette revue, une emphase majeure sera mise sur les mécanismes moléculaires de transduction du signal via la cascade JAK-STAT1 lors de l'activation du macrophage par l'IFN- γ . Un article scientifique englobant les principaux résultats obtenus lors de ce projet et ayant été soumis au cours des dernières semaines au journal *Cellular Microbiology* suivra enfin la revue de littérature.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. MACROPHAGE

Décris pour la première fois par Elie Metchnikoff en 1883, les macrophages (du grec *makros*, « grand », et *phagein*, « manger ») sont des cellules du système immunitaire dérivées des monocytes qui occupent une place centrale dans l’homéostasie, la défense innée de l’hôte et l’induction de réponses adaptatives. Ces phagocytes professionnels, spécialisés dans l’élimination des corps étrangers ainsi que des cellules apoptotiques, nécrotiques et sénescentes, acquièrent, suite à leur activation, de puissants mécanismes microbicides et deviennent d’excellentes cellules présentatrices d’antigènes (CPA). Grâce à ces fonctions, les macrophages jouent un rôle capital dans la destruction des agents pathogènes et le contrôle des infections. D’ailleurs, afin d’assurer leur survie, plusieurs microbes ont développé des stratégies visant à perturber l’activation du macrophage.

L’activation du macrophage et de ses fonctions microbicides se produit en réponse à une grande variété de stimuli, incluant la détection de motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs), tels que le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries, et l’exposition à diverses cytokines pro-inflammatoires, telles que les interférons (IFNs).

2. INTERFÉRON

2.1. Classification

Identifiés en 1957 pour leur capacité à *interférer* avec la réplication virale (Isaacs et Lindenmann 1957), les IFNs sont des cytokines pléiotropiques qui exercent des effets antiviraux et antiprolifératifs puissants intimement impliqués dans la surveillance immunitaire et la suppression des tumeurs. La famille des IFNs se divise en deux classes principales, les IFNs de types I et II, qui se distinguent entre autres par le récepteur qu’ils emploient et l’homologie de leur séquence. Les IFNs de type I (IFN- α , - β , - δ , - ϵ , - ζ , - κ , - τ et - ω) possèdent un taux d’homologie structurelle considérable et utilisent un récepteur commun (IFNAR), formé des polypeptides IFN α R1 et IFN α R2. Synthétisés chez divers types cellulaires en réponse à la reconnaissance de composantes virales ou bactériennes, telles que l’ARN double brin, les IFNs de type I constituent la première ligne de défense

contre les infections intracellulaires. De son côté l'IFN- γ , unique représentant de la classe des IFNs de type II, est différent structurellement des IFNs de type I, étant formé de deux chaînes polypeptidiques de 17 kDa glycosylées et associées de façon non covalente en position antiparallèle (Bach, Aguet et Schreiber 1997). L'IFN- γ se lie à un récepteur de surface distinct de l'IFNAR, soit l'IFNGR, composé des sous-unités IFN γ R1 (ou α) et IFN γ R2 (ou β). Sécrétée essentiellement par les lymphocytes T CD4 $^{+}$ de type Th1, les lymphocytes T CD8 $^{+}$ et les cellules NK (« Natural killer ») (Young 1996), cette cytokine est un puissant activateur du macrophage (une propriété qui lui a d'ailleurs valu le nom de « Macrophage-activating factor ») et induit chez cette cellule une panoplie de mécanismes antimicrobiens et autres fonctions cellulaires (Section 2.2).

Finalement, une nouvelle classe de cytokines similaires aux IFNs, les IFN- λ (IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3), aussi connus sous les noms d'interleukine (IL)-29, IL-28A et IL-28B, respectivement, a récemment été découverte. Ces molécules ont également des propriétés antivirales mais sont structurellement distinctes des IFNs de type I et II et utilisent un récepteur composé des chaînes IFN λ R1 (ou IL-28R α) et IL-10R β (Kotenko *et al.* 2003).

2.2. Effets cellulaires de l'IFN- γ

L'IFN- γ possède d'importantes propriétés immunomodulatoires lui accordant un rôle déterminant dans la défense de l'hôte contre les infections par les agents pathogènes vitaux, bactériens et parasitaires et dans la suppression des tumeurs. Cette cytokine, entre autres, dirige le développement et l'activation de nombreux types cellulaires, orchestre la migration des leukocytes, régule diverses fonctions des lymphocytes B telles que la commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) et exerce des effets antiprolifératifs et apoptotiques puissants (Boehm *et al.* 1997; Stark *et al.* 1998; Schroder *et al.* 2004). Chez le macrophage, l'IFN- γ stimule également la synthèse d'IL-12, la production de radicaux intermédiaires oxygénés (ROI) et nitrogénés (RNI), ainsi que la présentation antigénique via les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Schroder *et al.* 2004). Les effets biologiques de l'IFN- γ résultent essentiellement de la transcription de centaines de gènes impliqués dans ces évènements (Tableau 1) (Kota *et al.* 2006).

Tableau 1 : Exemples de gènes et de fonctions cellulaires stimulés par l'IFN- γ ¹

Présentation antigénique via le CMH I	
CMH I- α , β 2-microglobuline	Composantes de la molécule du CMH I
PA28 α , PA28 β	Sous-unités structurales du protéasome
LMP2, LMP7, MECL1	Sous-unités enzymatiques du protéasome
TAP-1, TAP-2	Transporteur associé à l'apprentissage des antigènes
Tapasine	Chaperone du réticulum endoplasmique associée au TAP
Présentation antigénique via le CMH II	
CMH II- α , CMH II- β	Composantes de la molécule du CMH II
Chaîne invariante (Ii)	Chaperone impliquée dans le trafic du CMH II
HLA-DM	Catalyse le chargement des peptides sur le CMH II
Cathepsines B, H et L	Protéases lysosomales
CIITA	Transactivateur de classe II
Réponse antivirale	
PKR	Protéine kinase régulée par l'ARN double brin
ADAR	Adénosine déaminase spécifique à l'ARN double brin
Arrêt de la prolifération	
p21, p27	Inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes CDK2 et CDK4
Mad1	Antagoniste du facteur de transcription c-myc
Apoptose	
Caspase-1	Cystéine protéase impliquée dans la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β bioactif et IL-18 et dans l'apoptose
FasR/FasL	Récepteur Fas et ligand Fas, inducteurs de l'apoptose
TNFR	Récepteur du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α)
Production de NO	
iNOS/NOS2	Catalyse la conversion de L-arginine en L-citrulline et NO
Argininosuccinate synthétase	Produit le substrat L-arginine nécessaire à la production de NO
Guanosine triphosphate (GTP)-cyclohydroxylase	Produit un co-facteur requis pour la production de NO, la tétrahydrobioptérine
Production de ROI	
gp47 ^{phox} , gp67 ^{phox} , gp91 ^{phox}	Sous-unités membranaires et cytosoliques de la NADPH oxydase
Développement, traffic et activation des leukocytes	
IL-12	Activation des cellules NK et différenciation des lymphocytes T vers le phénotype Th1
IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES	Chimiokines impliquées dans la migration des lymphocytes T et des monocytes/macrophages
ICAM-1, VCAM-1	Molécules d'adhésion impliquées dans le traffic des leukocytes
CD86/B7.2	Molécule de co-stimulation des lymphocytes T

¹Adapté de (Schroder *et al.* 2004)

2.2.1. Production de radicaux intermédiaires oxygénés et nitrogénés

Un des effets les plus importants de l'IFN- γ sur le macrophage est l'activation de ses fonctions microbicides, incluant la production de ROI et de RNI. L'IFN- γ stimule la production de superoxyde via la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, un processus appelé flambée oxydative, en augmentant l'expression de certaines composantes de la NADPH oxydase telles que la sous-unité membranaire gp91^{phox} (Ezekowitz, Orkin et Newburger 1987; Newburger *et al.* 1988; Mazzi *et al.* 2004). Le superoxyde produit par la flambée oxydative réagit spontanément pour former de nombreux dérivés toxiques, qui endommagent l'ADN et engendrent l'oxydation des lipides et des protéines de la cellule.

L'activation du macrophage engendre également la production d'oxyde nitrique, un métabolite de courte durée de vie mais fort毒ique. Ce composé, produit lors de la conversion NADPH-dépendante de la L-arginine en L-citrulline par les synthétases de NO (NOS), détruit les agents pathogènes de plusieurs façons (MacMicking, Xie et Nathan 1997). Par exemple, le NO peut réagir avec le superoxyde produit par la NADPH oxydase pour former un oxydant très puissant, le peroxynitrite (Radi *et al.* 1991a, 1991b). L'IFN- γ promeut la production de NO chez le macrophage en stimulant l'expression de la seule NOS inducible (iNOS/NOS2; nNOS/NOS1 et eNOS/NOS3 étant exprimées de façon constitutive chez les neurones et les cellules endothéliales, respectivement) et d'enzymes responsables de la production de substrats et de co-facteurs essentiels à la réaction catalysée par les NOS (MacMicking, Xie et Nathan 1997; Schroder *et al.* 2004).

2.2.2. Présentation antigénique via le CMH II

L'expression du CMH de classe II, constitutive presque exclusivement chez les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les lymphocytes B, est inducible par divers stimuli chez de nombreux types cellulaires (Ting et Trowsdale 2002). Chez le macrophage, l'IFN- γ stimule l'expression de plusieurs protéines accessoires essentielles à la présentation antigénique via le CMH II, telles que les chaînes α et β du CMH II, la chaîne invariante (Ii) et la molécule Human Leukocyte Antigen (HLA)-DM (Tableau 1)

(Paulnock-King *et al.* 1985; Chang et Flavell 1995). La transcription des gènes codant pour ces protéines est sous le contrôle du transactivateur de classe II (CIITA), qui est recruté à la région proximale de leur promoteur via de multiples interactions synergiques avec un complexe amplificateur macromoléculaire (Masternak *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2000). CIITA dirige la transcription en orchestrant le recrutement de facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine et la coordination des étapes de la transcription (Spilianakis *et al.* 2003).

L'expression du CIITA est contrôlée par trois promoteurs actifs différents, soit pI, pIII et pIV (pII, présent chez l'humain seulement, est rarement exprimé et son rôle est peu connu) qui précèdent chacun un premier exon distinct et qui génèrent donc des transcrits d'ARNm possédant des extrémités 5' uniques. L'utilisation de ces promoteurs varie selon le type cellulaire et le stimulus. Ainsi, les promoteurs pI et pIII régulent l'expression constitutive de CIITA chez les cellules dendritiques et les lymphocytes B, respectivement, tandis que le promoteur pIV est inducible par l'IFN- γ chez divers types cellulaires (Muhlethaler-Mottet *et al.* 1998). Notons toutefois que cette répartition des tâches n'est pas absolue (LeibundGut-Landmann *et al.* 2004). Par exemple, le promoteur pI, qui module également la transcription du CMH II chez les macrophages, semble aussi être induit par l'IFN- γ chez ces cellules (Waldburger *et al.* 2001; Pai *et al.* 2002).

2.3. Signalisation de l'IFN- γ

L'induction des effets biologiques de l'IFN- γ implique l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. La cascade JAK-STAT1 joue un rôle capital dans la transmission du signal de l'IFN- γ , bien que l'obtention du spectre complet d'effets biologiques de l'IFN- γ implique aussi la coopération de diverses voies indépendantes de STAT1 (Platanias et Fish 1999; Gil *et al.* 2001; Ramana *et al.* 2001; Ramana *et al.* 2002; Platanias 2005; van Boxel-Dezaire et Stark 2007). Les sections suivantes décriront les membres de la voie JAK-STAT1 induite par l'IFN- γ , le mécanisme de transduction du signal via cette cascade et les diverses protéines impliquées dans sa régulation négative.

2.3.1. Récepteur

Le récepteur de l'IFN- γ se compose des chaînes IFN γ R α et IFN γ R β qui, en raison de la structure dimérique de la cytokine, se retrouvent en deux copies au sein du récepteur fonctionnel. Les sous-unités IFN γ R α et IFN γ R β sont exprimées de façon constitutive, mais leur disponibilité à la surface de la cellule varie : tandis que la chaîne IFN γ R α s'y trouve généralement en surplus, l'expression de la chaîne IFN γ R β est finement contrôlée, et représente le facteur limitant dans la capacité des cellules à répondre à l'IFN- γ (Bach, Aguet et Schreiber 1997; Bernabei *et al.* 2001; Regis *et al.* 2006).

La structure des sous-unités IFN γ R α et IFN γ R β et les motifs qu'elles contiennent leur accordent des fonctions particulières dans l'induction des réponses à l'IFN- γ (Figure 1). Ainsi, la chaîne IFN γ R α est principalement responsable de la liaison au ligand, alors que la chaîne IFN γ R β exerce plutôt un rôle accessoire (Marsters *et al.* 1995; Bach, Aguet et Schreiber 1997). IFN γ R α possède une longue queue cytoplasmique indispensable à la transduction du signal grâce à la séquence 440 YDKPH 444 située près de son extrémité carboxy (C)-terminale. La phosphorylation du résidu Y 440 de ce motif crée un site de recrutement pour le facteur de transcription STAT1 (Greenlund *et al.* 1994). En revanche, la chaîne IFN γ R β , dont la queue cytoplasmique est très courte, n'est pas phosphorylée en réponse à l'IFN- γ (Kotenko *et al.* 1995; Sakatsume *et al.* 1995), mais est néanmoins nécessaire à la fonction du récepteur et à la signalisation intracellulaire (Hemmi *et al.* 1994). Les chaînes IFN γ R α et IFN γ R β sont toutes deux dépourvues d'activité catalytique intrinsèque (Ihle 1995). Afin de pallier cette lacune, elles s'associent via la région membrane-proximale de leur domaine intracellulaire aux *Janus* kinases JAK1 et JAK2, respectivement (Greenlund *et al.* 1994; Sakatsume *et al.* 1995; Bach *et al.* 1996; Kaplan *et al.* 1996), qui activeront la cascade de transduction du signal.

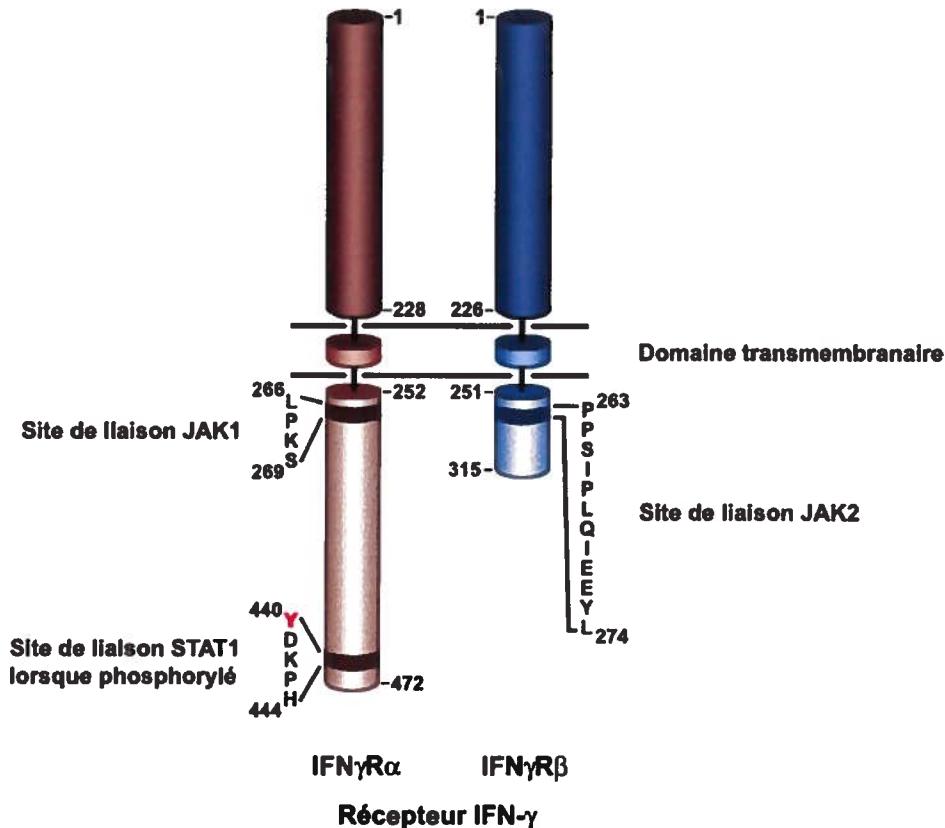


Figure 1 : Structure générale des sous-unités du récepteur à l'IFN- γ .

La localisation du site critique de phosphorylation (en rouge) et des sites de liaison des protéines associées aux chaînes IFN γ R α et IFN γ R β est indiquée.

2.3.2. JAK

Les quatre membres de la famille des *Janus* kinases (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) sont des protéines ubiquitaires (à l'exception de JAK3 dont l'expression est restreinte aux cellules d'origine hématopoïétique) d'environ 120-140 kDa qui présentent 7 domaines d'homologie à JAK (JH1-JH7). Les JAKs jouent un rôle primordial dans la signalisation des cytokines, incluant les IFN- α / β et - γ (Rane et Reddy 2000) : les cellules déficientes en JAK1 ou Tyk2 sont insensibles aux IFN- α / β , et celles déficientes en JAK1 ou JAK2 ne répondent pas à l'IFN- γ (Velazquez *et al.* 1992; Müller *et al.* 1993; Watling *et al.* 1993). JAK3 est, quant à elle, responsable de la signalisation via la chaîne γ commune à de multiples récepteurs d'interleukines (Leonard et O'Shea 1998; Suzuki *et al.* 2000)

La découverte simultanée des JAKs à celle de plusieurs autres protéines tyrosine kinases (PTK) leur a valu l'acronyme « Juste une Autre Kinase », nom peu représentatif de l'importance de leurs fonctions. Elles furent éventuellement renommées *Janus* kinases d'après le dieu romain éponyme à deux faces, en raison de la présence insolite de deux domaines kinases en région C-terminale (JH1 et JH2). Seul JH1 semble être fonctionnel toutefois; le domaine JH2 est plutôt une pseudo-kinase dépourvue d'activité catalytique dû à l'absence d'acides aminés essentiels à la fonction kinase (Wilks *et al.* 1991). Les JAKs sont activées par la phosphorylation de résidus tyrosine critiques dans la boucle d'activation (Gauzzi *et al.* 1996; Feng *et al.* 1997; Liu *et al.* 1997; Chatti, Farrar et Duhe 2004) et comptent parmi leurs principaux substrats les récepteurs auxquels elles sont associées ainsi que les protéines STATs.

2.3.3. STAT

La famille des STATs, qui regroupe sept membres chez les mammifères (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6), occupe une position centrale dans la transduction du signal induit par plus de 50 cytokines et facteurs de croissance (Subramaniam, Torres et Johnson 2001). Les IFNs de type I engendrent la formation de divers complexes homodimériques, hétérodimériques et hétérotrimériques de STATs; en revanche, la signalisation de l'IFN- γ procède presque exclusivement via un homodimère de STAT1, aussi connu sous le nom de facteur d'activation de l'IFN- γ (GAF) (Platanias 2005).

Les protéines STATs, dont la taille varie entre 90 et 115 kDa, sont composées de six domaines aux fonctions particulières (Fig. 2) (Levy et Darnell 2002; Brierley et Fish 2005). Le domaine amino (N)-terminal est impliqué dans la translocation nucléaire et la déphosphorylation des STATs et dans la formation de tétramères sur certains promoteurs (Shuai, Liao et Song 1996; Vinkemeier *et al.* 1996; Strehlow et Schindler 1998; Mertens *et al.* 2006), tandis que le domaine en faisceau d'hélices α torsadées (« coiled-coil ») qui le suit sert de plateforme pour de nombreuses interactions protéiques (Lim et Cao 2006). Les STATs dirigent la transcription des gènes stimulés par les IFNs en se liant aux

séquences activées par l'IFN- γ (GAS) situées au sein de leur promoteur. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), qui se trouve au centre de la protéine, remplit une fonction double chez STAT1 en permettant cette liaison et en arborant les séquences impliquées dans le trafic nucléocytoplasmique de STAT1 (McBride, McDonald et Reich 2000; Melén, Kinnunen et Julkunen 2001; Fagerlund *et al.* 2002; McBride *et al.* 2002). Le domaine de liaison (« linker »), qui semble être important pour l'activation de la transcription par STAT1 en réponse à l'IFN- γ (Yang *et al.* 1999), relie le DBD à un domaine SH2, essentiel à l'interaction des STATs avec les récepteurs phosphorylés et à la formation subséquente de dimères de STATs (Heim *et al.* 1995). Enfin, le domaine de transactivation (TD), situé à l'extrémité C-terminale, termine la protéine.

L'activation des STATs nécessite la phosphorylation d'un résidu tyrosine situé à environ 700 acides aminés de l'extrémité N-terminale (Y⁷⁰¹ chez STAT1), qui permet la dimérisation des STATs via des interactions phosphotyrosyl-SH2 réciproques, engendre la translocation nucléaire du dimère et lui confère la capacité de se lier à l'ADN (Shuai *et al.* 1994; Sekimoto *et al.* 1997). L'acquisition d'une activité transcriptionnelle maximale requiert toutefois la phosphorylation d'un résidu sérine du TD (S⁷²⁷ chez STAT1) (Wen, Zhong et Darnell 1995; Horvath et Darnell 1996; Decker et Kovarik 2000; Visconti *et al.* 2000). Il appert que la phosphorylation de S⁷²⁷ promeut l'interaction de STAT1 avec des co-activateurs nucléaires impliqués dans le remodelage de la chromatine, tels que les histone acétyltransférases p300/CBP (Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc)) (Zhang *et al.* 1996a; Varinou *et al.* 2003). Enfin, d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, la méthylation, l'ISGylation, la SUMOylation et l'ubiquitinylation peuvent également modifier l'activité ou l'expression des STATs (Lim et Cao 2006).

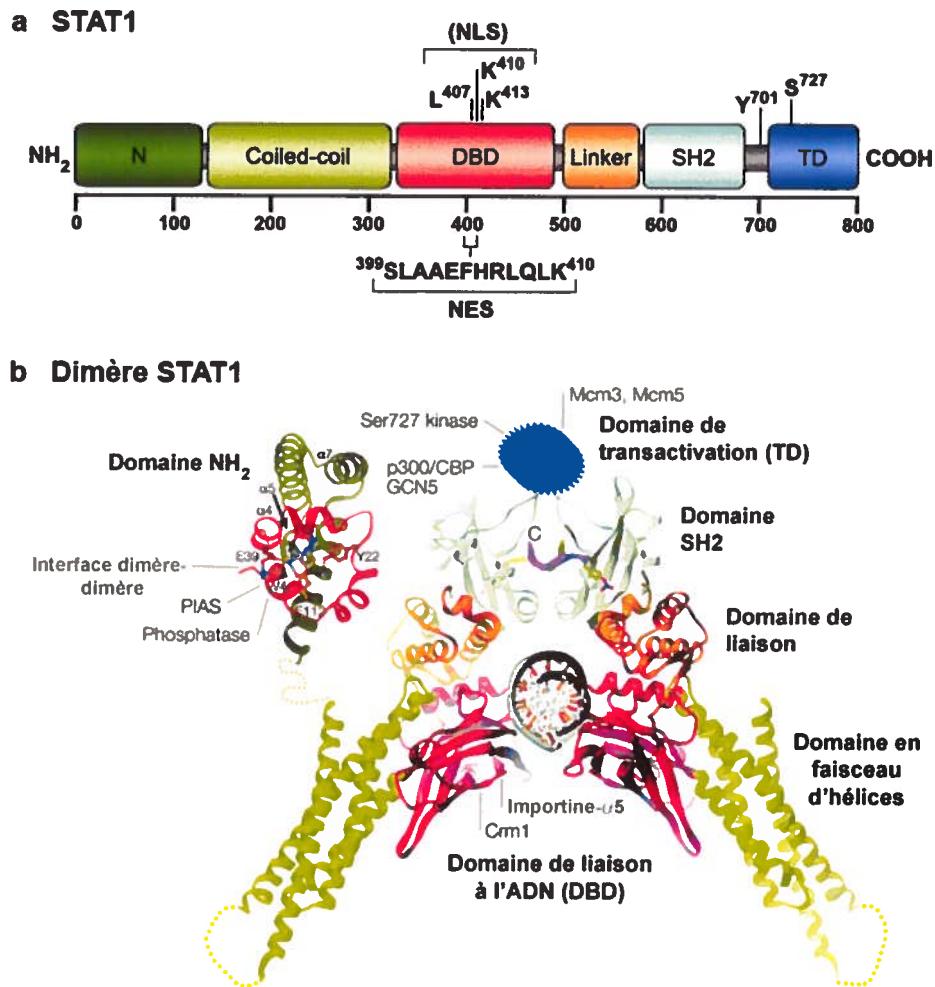


Figure 2 : Structure fonctionnelle et tridimensionnelle de STAT1.

(a) Domaines de la protéine STAT1 et position des résidus importants pour son activation et sa translocation nucléaire en réponse à l'IFN- γ . (b) Diagramme en rubans du complexe de l'homodimère de STAT1 lié à l'ADN. Les sites de liaison de diverses protéines interagissant avec STAT1 sont indiqués. Modifiée de (Levy et Darnell 2002).

2.3.4. Les facteurs régulateurs de l'IFN (IRFs)

Les membres de la famille des facteurs régulateurs de l'IFN (IRF-1 à -9) sont intimement impliqués dans l'induction des réponses aux IFNs de type I et II. Ces facteurs de transcription dirigent l'expression des gènes stimulés par les IFNs en interagissant avec les éléments de réponse stimulés par l'IFN (ISRE) situés dans leur promoteur. L'IFN- γ induit l'expression de IRF-1 via la liaison de STAT1 au site GAS situé dans la

région proximale de son promoteur (Harada *et al.* 1994; Pine, Canova et Schindler 1994). IRF-1 joue à son tour un rôle primordial dans l'induction des effets biologiques de l'IFN- γ en se liant à une séquence imbriquée au sein des ISRE des gènes stimulés par l'IFN- γ (ISGs), surnommée élément de liaison aux IRF (IRF-E) (Section 2.3.5) (Taniguchi, Lamphier et Tanaka 1997).

D'autres membres de la famille des IRF semblent également être impliqués dans la modulation des réponses transcriptionnelles à l'IFN- γ , tels que IRF-2, un régulateur négatif constitutif qui reconnaît aussi le motif IRF-E, mais agit plutôt comme répresseur de la transcription (Harada *et al.* 1989). L'IFN- γ induit aussi l'expression de IRF-8, mais le rôle de cette protéine dans la réponse à l'IFN- γ est controversé, ayant un effet parfois positif et parfois négatif sur l'expression des ISGs (Nelson *et al.* 1993; Xiong *et al.* 2003; Vila-del Sol, Punzón et Fresno 2008).

2.3.5. Transduction du signal via la cascade JAK-STAT1

Depuis sa découverte au début des années 1990, la voie JAK-STAT1 activée par l'IFN- γ a été rigoureusement étudiée et les événements de signalisation qui la composent ont été caractérisés en détail (Fig. 3a) (Schroder *et al.* 2004). La liaison de l'IFN- γ à deux chaînes IFN γ R α entraîne l'assemblage d'un récepteur fonctionnel par l'association d'une sous-unité β à chaque sous-unité α (Greenlund *et al.* 1993; Marsters *et al.* 1995; Bach *et al.* 1996). Notons toutefois que des études récentes suggèrent que les sous-unités du récepteur soient pré-assemblées en l'absence de ligand (Krause *et al.* 2002; Krause *et al.* 2006). La cascade de transduction du signal induite suite à la liaison de l'IFN- γ comprend une série de quatre événements cruciaux de phosphorylation sur des résidus tyrosine. Tout d'abord, le rapprochement des JAKs associées à leur chaîne respective entraîne l'auto-phosphorylation de JAK2 qui, une fois activée, trans-phosphoryle JAK1 (Briscoe *et al.* 1996). Ensuite, JAK1 phosphoryle le résidu Y⁴⁴⁰ de chaque sous-unité IFN γ R α , ce qui crée deux sites de recrutement adjacents pour le domaine SH2 des STAT1 latents (Heim *et al.* 1995; Briscoe *et al.* 1996). Les deux monomères de STAT1 ainsi recrutés sont phosphorylés sur leur résidu Y⁷⁰¹, probablement par JAK2 (Briscoe *et al.* 1996), puis

se dissocient du récepteur pour former un homodimère actif (Greenlund *et al.* 1995). Enfin, cet homodimère transloque au noyau (Section 2.3.6) et active la transcription des ISGs en se liant aux séquences GAS présentes dans les promoteurs de ces gènes. La première vague de transcription induite par l'IFN- γ engendre l'expression de facteurs de transcription, tels que IRF-1, qui aideront ensuite à diriger la seconde vague de transcription génique des ISGs, où de nombreux gènes impliqués dans la destruction des microbes et dans la présentation antigénique sont induits. Par exemple, STAT1 et IRF-1 dirigent de façon coopérative l'expression de l'iNOS et du CIITA en réponse à l'IFN- γ en se liant aux éléments GAS et ISRE/IRF-E respectivement de leur promoteur (Fig. 3b) (Kamijo *et al.* 1994; Martin, Nathan et Xie 1994; Meraz *et al.* 1996; Muhlethaler-Mottet *et al.* 1998).

Au cours de cette cascade d'activation, STAT1 devient également phosphorylé sur le résidu S⁷²⁷ de son domaine de transactivation. Alors que les implications biologiques de cette phosphorylation sont maintenant bien reconnues (Section 2.3.3), le mécanisme par lequel elle se produit, y compris l'identité de la sérine kinase qui en est responsable, est encore nébuleux. Selon le type cellulaire, différents membres de la famille des protéines kinases C (PKC) semblent contribuer à la phosphorylation de STAT1 sur S⁷²⁷, telles que la PKC- α (Hardy *et al.* 2009), la PKC- δ (Deb *et al.* 2003; Kwon *et al.* 2007) et la PKC- ϵ (Choudhury 2004). Un rôle pour la phosphatidylinositol-3'kinase (Nguyen *et al.* 2001; Choudhury 2004) et la protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline-dépendante (Nair *et al.* 2002) a également été suggéré.

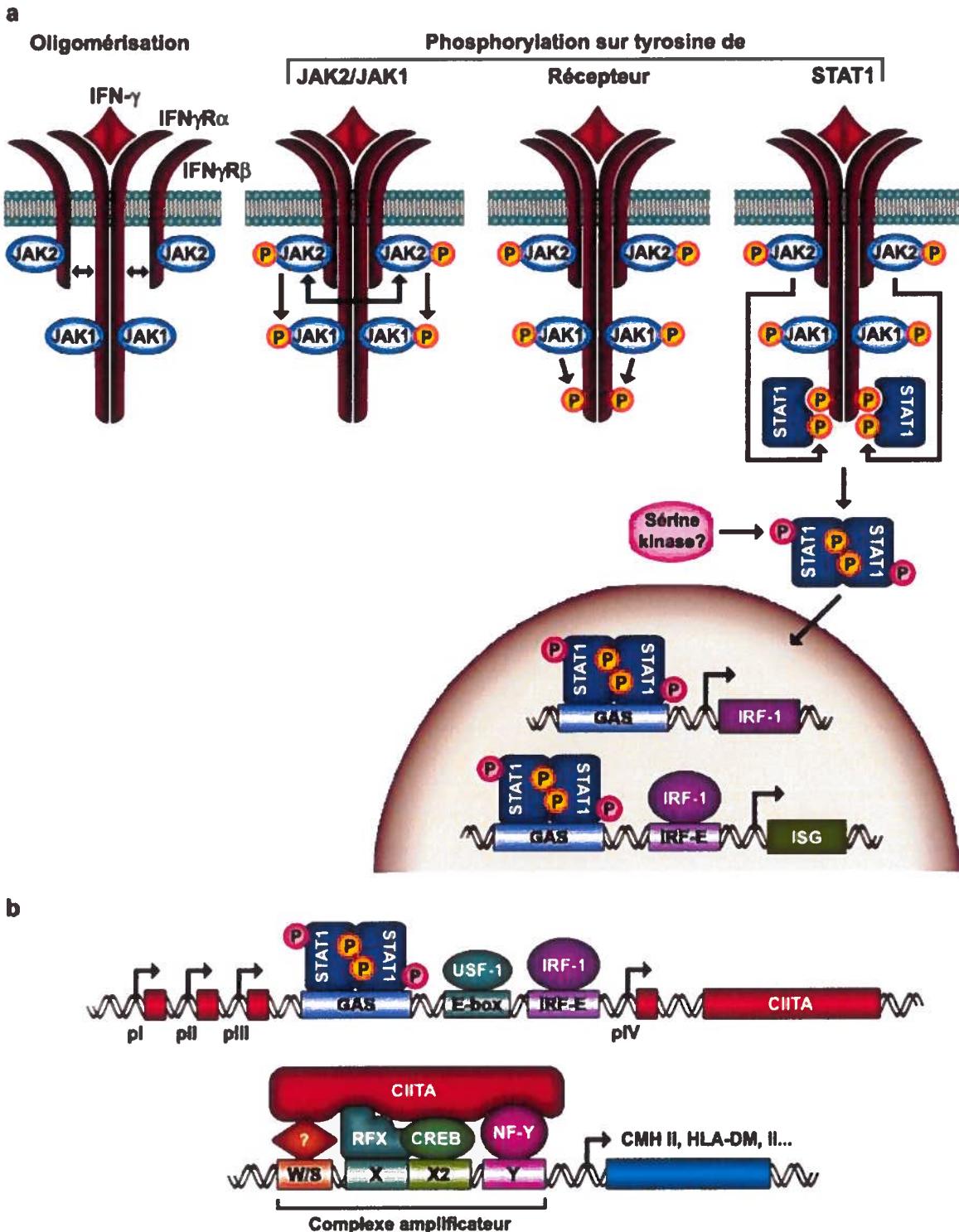


Figure 3 : Activation de la cascade JAK-STAT1 et de l'expression du CMH de classe II par l'IFN- γ .

(a) La liaison de l'IFN- γ à la chaîne IFN γ RA engendre l'assemblage du récepteur, l'auto-

et la trans-phosphorylation des JAKs, puis la phosphorylation du récepteur par JAK1, ce qui crée un site de recrutement pour STAT1. La phosphorylation subséquente de STAT1 par JAK2 entraîne la formation d'homodimères actifs de STAT1, qui transloquent au noyau afin d'induire la transcription des ISGs. (b) La transcription du CIITA de type IV, en réponse à l'IFN- γ , nécessite la liaison coopérative de STAT1, de IRF-1 et du facteur USF-1 (« Upstream stimulatory factor-1 ») au promoteur pIV. À son tour, le CIITA dirige la transcription de gènes impliqués dans la présentation antigénique via le CMH II en se liant au promoteur de ces gènes via un complexe amplificateur.

2.3.6. Translocation nucléaire de STAT1

Contrairement à l'activation de la cascade JAK-STAT1, le processus de transport nucléocytoplasmique de STAT1 en réponse à l'IFN- γ est peu connu. (Levy et Darnell 2002; Meyer et Vinkemeier 2004; Reich et Liu 2006; Reich 2007). Des études effectuées au cours de la dernière décennie ont démontré un rôle important pour divers membres de la famille des importines dans la translocation nucléaire des STATs.

2.3.6.1. *Les importines*

Les gros complexes protéiques doivent utiliser un moyen de transport facilité afin de traverser la membrane nucléaire. Ces événements de translocation sont guidés par la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'export nucléaire (NES). Des protéines appelées karyophérines reconnaissent les cargos arborant ces signaux et les transportent du cytoplasme vers le noyau (importines) ou vice-versa (exportines), grâce à l'énergie fournie par la guanosine triphosphatase (GTPase) Ran (Görlich *et al.* 1996; Macara 2001). Les membres de la famille des importines- α (six chez l'humain, soit l'importine- $\alpha 1$, - $\alpha 3$, - $\alpha 4$, - $\alpha 5$, - $\alpha 6$ et - $\alpha 7$) sont des adaptateurs d'import nucléaire reconnaissant les NLS mono- ou bipartites classiques via une série de motifs de type « armadillo » (ARM) situés dans la portion centrale de la protéine (Fig. 4a) (Conti *et al.* 1998; Fontes, Teh et Kobe 2000). Quant à elle, l'importine- $\beta 1$ interagit simultanément avec les nucléoporines du complexe de pore nucléaire (NPC) et le complexe cargo-

importine- α afin de permettre leur transport à travers la membrane nucléaire (Görlich *et al.* 1995; Chook et Blobel 2001).

2.3.6.2. Import nucléaire de STAT1 par l'importine- α 5

La translocation nucléaire de plusieurs STATs, dont STAT1, STAT2 et STAT3, nécessite la participation des membres de la famille des importines- α (Sekimoto *et al.* 1997; McBride *et al.* 2002; Banninger et Reich 2004; Liu, McBride et Reich 2005; Ma et Cao 2006). STAT1 interagit avec les importines- α 5 et - α 7 en réponse à l'IFN- γ (Ma et Cao 2006). L'importine- α 5, en conjonction avec l'importine- β 1 et l'activité de la GTPase Ran, semble toutefois être la principale karyophérine impliquée dans l'import nucléaire de STAT1 en réponse à l'IFN- γ (Fig. 4b) (Sekimoto *et al.* 1996; Sekimoto *et al.* 1997; McBride *et al.* 2002). STAT1 ne possède pas de NLS conventionnel; plutôt, une séquence riche en arginines et en lysines située dans le domaine de liaison à l'ADN est exposée suite à la phosphorylation de STAT1 sur Y⁷⁰¹ et son homodimérisation subséquente (Fig. 2) (Melén, Kinnunen et Julkunen 2001; Fagerlund *et al.* 2002; McBride *et al.* 2002). Ce NLS spécifique aux dimères (dsNLS) est alors reconnu par le domaine C-terminal de l'importine- α 5 plutôt que ses motifs ARM centraux (Sekimoto *et al.* 1997; Melén *et al.* 2003). Notons enfin que des études ont indiqué l'existence d'un mécanisme de trafic nucléocytoplasmique constitutif de STAT1 non phosphorylé, indépendant de l'importine- β 1 (Meyer *et al.* 2002; Marg *et al.* 2004). Les fonctions nucléaires des molécules non phosphorylées de STAT1 sont toutefois peu connues.

a Importine- α



b

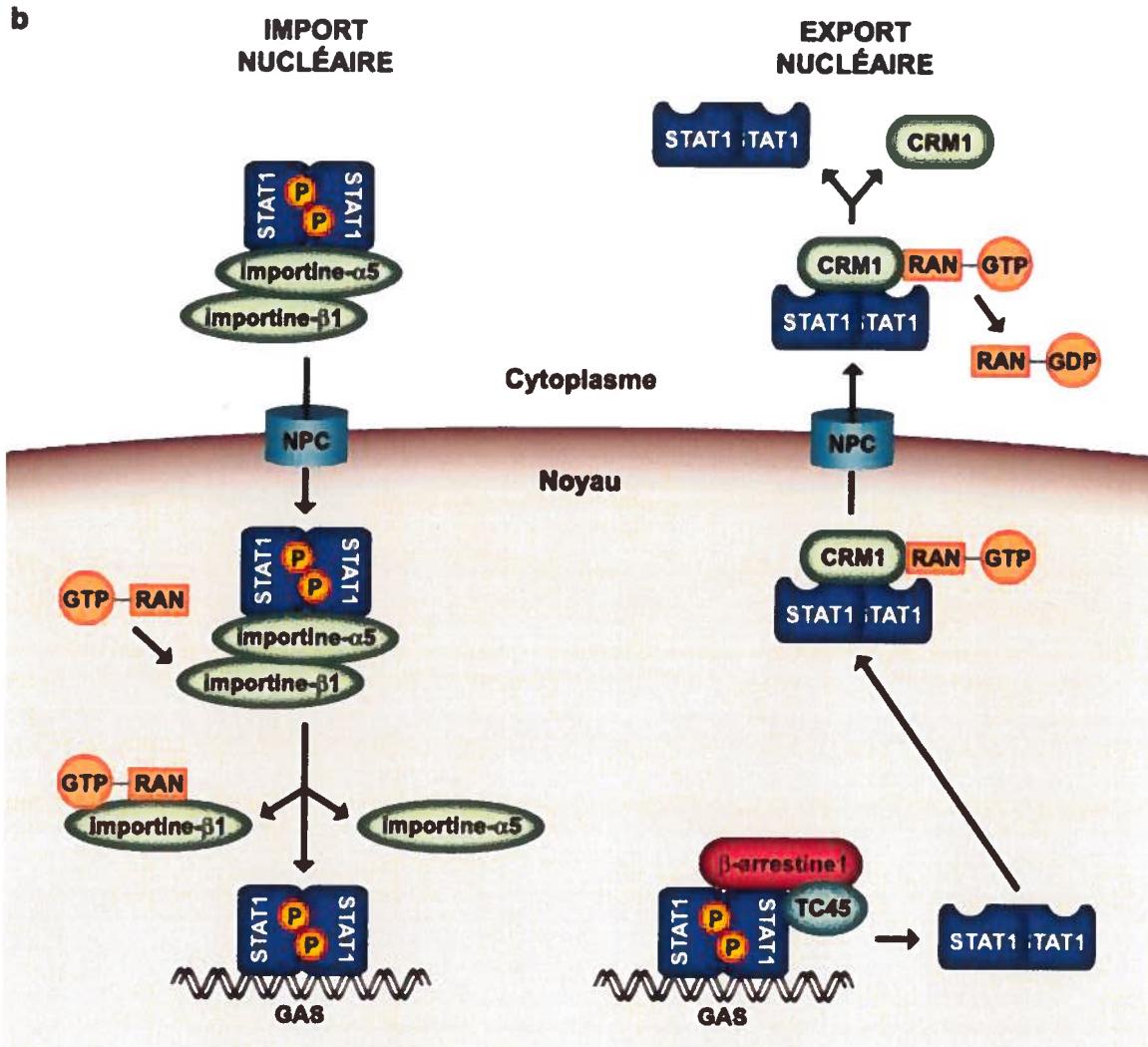


Figure 4 : Transport nucléocytoplasmique de STAT1 induit par l'IFN- γ .

(a) Schéma représentatif de la structure des membres de la famille des importines- α , incluant les domaines de liaison à l'importine- $\beta 1$ et à STAT1 ainsi que la série de 10 motifs ARM. (b) Mécanisme d'import et d'export nucléaire de STAT1 en réponse à l'IFN- γ . Adaptée de (Reich et Liu 2006).

2.3.7. Inactivation et export nucléaire de STAT1

Une exposition prolongée à l'IFN- γ engendre des effets néfastes chez la cellule en induisant non seulement l'arrêt de sa prolifération, mais aussi son apoptose (Schroder *et al.* 2004). La durée et l'intensité du signal et des évènements de transcription qui en découlent sont donc étroitement contrôlées. Ainsi, la rétention de STAT1 au noyau n'est que temporaire : au bout de quelques heures, la tyrosine phosphatase nucléaire TC45 déphosphoryle le résidu Y⁷⁰¹ de STAT1, qui retourne au cytoplasme sous sa forme inactive (Haspel, Salditt-Georgieff et Darnell 1996; Haspel et Darnell 1999; ten Hoeve *et al.* 2002). Cet évènement de déphosphorylation est promu par la β -arrestine1, qui sert d'échafaud pour le recrutement de TC45 et son association à STAT1 (Mo *et al.* 2008), et implique la réorientation spatiale de chaque monomère en position antiparallèle (Fig. 4) (Mertens *et al.* 2006). L'export de STAT1 du noyau vers le cytoplasme est effectué par la karyophérine CRM1 (« Chromosome region maintenance 1 »; exportine-1), qui reconnaît une séquence riche en leucines située dans le DBD de STAT1 de manière Rang-dépendante (Fig. 2a, 4) (McBride, McDonald et Reich 2000).

La déphosphorylation du résidu Y⁷⁰¹ de STAT1 est indispensable à l'export de la protéine par CRM1 (Haspel et Darnell 1999; McBride, McDonald et Reich 2000; Meyer *et al.* 2003). Or, la liaison à l'ADN protège STAT1 contre l'inactivation par TC45 et l'export subséquent vers le cytoplasme (McBride, McDonald et Reich 2000; Meyer *et al.* 2003). Les mécanismes qui coordonnent la dissociation de STAT1 de la chromatine, sa déphosphorylation par TC45 et son export nucléaire demeurent à ce jour peu connus.

2.3.8. Régulation négative de la voie JAK-STAT1

En plus de la terminaison du signal via la déphosphorylation de STAT1 par TC45, la régulation négative de la voie JAK-STAT1 et des réponses à l'IFN- γ s'effectue par plusieurs autres mécanismes (Shuai et Liu 2003). Les protéines tyrosine phosphatases (PTP) et les membres de la famille des suppresseurs de la signalisation des cytokines (SOCS) sont d'importants régulateurs négatifs de la voie JAK-STAT (Krebs et Hilton 2001; Croker, Kiu et Nicholson 2008; Xu et Qu 2008). La tyrosine phosphatase contenant

un domaine 2 d'homologie à Src (SHP)-1, par exemple, inhibe les réponses à l'IFN- γ en déphosphorylant JAK2, alors que SOCS1 et SOCS3 obstruent plutôt son site catalytique (Jiao *et al.* 1996; Endo *et al.* 1997; Sasaki *et al.* 1999; Yasukawa *et al.* 1999).

Divers mécanismes régulent l'activité transcriptionnelle de STAT1 dans le noyau. Tel que décrit dans la section 2.3.7., la tyrosine phosphatase nucléaire TC45 inactive STAT1 en déphosphorylant le résidu Y⁷⁰¹. La protéine inhibitrice des STATs activés (PIAS) 1 bloque la liaison de STAT1 à l'ADN (Liu *et al.* 1998; Liu *et al.* 2004), tandis qu'un autre membre de la famille, PIASY, inhibe l'activité transactivatrice de STAT1 en agissant en tant que co-répresseur de la transcription (Liu *et al.* 2001). Enfin, STAT1 β (p84), une forme dominante négative de STAT1 produite par épissage alternatif et dépourvue du domaine de transactivation, inhibe indirectement les fonctions de l'isoforme actif STAT1 α (p91) en occupant les sites GAS du promoteur des ISGs sans toutefois induire leur transcription (Zakharova *et al.* 2003).

2.4. Modulation de la cascade JAK-STAT1 par des agents pathogènes

Les réponses à l'IFN- γ et la signalisation via la voie JAK-STAT1 jouent un rôle capital dans la résistance de l'hôte contre les microbes intracellulaires. En effet, les souris déficientes en IFN- γ , IFN γ R α ou STAT1 sont particulièrement susceptibles à de nombreuses infections virales, bactériennes et parasitaires (Buchmeier et Schreiber 1985; Suzuki *et al.* 1988; Huang *et al.* 1993; Durbin *et al.* 1996; Meraz *et al.* 1996; Jouanguy *et al.* 1999; Rosas *et al.* 2003; Rothfuchs *et al.* 2006; Späth *et al.* 2009). La cascade JAK-STAT1 représente donc une cible idéale pour les agents pathogènes ayant un style de vie intracellulaire (Tableau 2). Les prochaines sections traiteront du parasite *Leishmania* et des mécanismes d'évasion exploités par ce micro-organisme pour inhiber l'activation du macrophage et les réponses à l'IFN- γ .

Tableau 2 : Modulation de la voie JAK-STAT1 par les microbes intracellulaires

Diminution de l'expression du récepteur, des JAKs ou de STAT1	
<i>Francisella novicida</i>	(Roth <i>et al.</i> 2009)
<i>Leishmania donovani, major et mexicana</i>	(Ray <i>et al.</i> 2000; Bhardwaj <i>et al.</i> 2005; Forget, Gregory et Olivier 2005)
<i>Mycobacterium avium</i>	(Hussain, Zwilling et Lafuse 1999)
Virus de l'herpès simplex 1	(Eisemann <i>et al.</i> 2007)
Inhibition de la phosphorylation des JAKs ou de STAT1	
<i>Escherichia coli</i>	(Ceponis <i>et al.</i> 2003)
<i>Leishmania donovani et amazonensis</i>	(Nandan et Reiner 1995; Blanchette <i>et al.</i> 1999; Ray <i>et al.</i> 2000; Xin, Li et Soong 2008)
Virus de l'encéphalite à tiques	(Best <i>et al.</i> 2005)
Virus de l'encéphalite équine du Vénézuela	(Simmons <i>et al.</i> 2009)
Inhibition de la translocation nucléaire de STAT1	
Coronavirus du Syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS)	(Frieman <i>et al.</i> 2007)
Virus Ébola	(Reid <i>et al.</i> 2006; Reid <i>et al.</i> 2007)
Virus de la rage	(Vidy <i>et al.</i> 2007)
Inhibition de l'interaction STAT1-p300/CBP	
<i>Brucella suis</i>	(Bouhet <i>et al.</i> 2009)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Ting <i>et al.</i> 1999)
Induction de régulateurs négatifs	
Cytomégalovirus humain (SHP-2)	(Baron et Davignon 2008)
<i>Francisella novicida</i> (SOCS3)	(Parsa <i>et al.</i> 2008)
<i>Leishmania donovani</i> (SHP-1 et SOCS3) et <i>mexicana</i> (STAT1β)	(Blanchette <i>et al.</i> 1999; Bertholet <i>et al.</i> 2003; Bhardwaj <i>et al.</i> 2005)
<i>Listeria monocytogenes</i> (SOCS3)	(Stoiber <i>et al.</i> 2001)
<i>Toxoplasma gondii</i> (SOCS1)	(Zimmermann <i>et al.</i> 2006)
Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)-1 (SOCS2)	(Cheng <i>et al.</i> 2009)
Virus syncytial respiratoire (STAT1β)	(Senft <i>et al.</i> 2009)

3. LEISHMANIA

Les parasites protozoaires du genre *Leishmania* sont des organismes unicellulaires de la famille des *Trypanosomatidae* (de l'Ordre des *Kinetoplastida*) pourvus d'un unique flagelle et d'une organelle riche en ADN et semblable aux mitochondries, le kinétoplaste. Cette famille comprend au moins 30 espèces de *Leishmania*, dont près d'une vingtaine sont pathogéniques pour l'humain (Fig. 5). Transmis par la mouche des sables du genre

Phlebotomus (Ancien Monde, soit l'Europe de l'Est, l'Afrique, l'Asie, l'Inde, et le Moyen-Orient) ou *Lutzomyia* (Nouveau Monde, soit l'Amérique du Sud et l'Amérique Centrale), *Leishmania* est l'agent étiologique d'un large spectre de maladies appelées leishmanioses. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces maladies menacent plus de 350 millions d'individus à travers 88 pays situés au sein des régions tropicales et subtropicales du monde ainsi que dans le bassin Méditerranéen (Desjeux 2004).

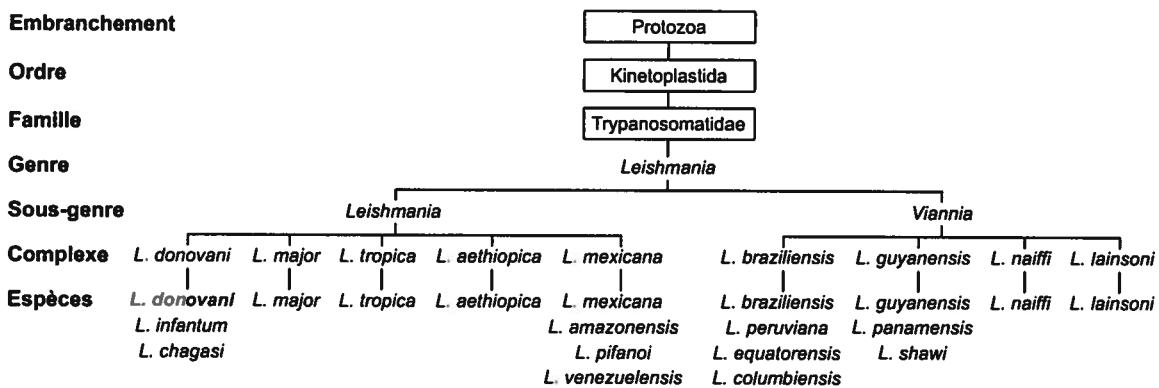


Figure 5 : Classification des principales espèces de *Leishmania*.

La classification de *L. donovani*, l'espèce étudiée dans le cadre de ce projet, y est mise en évidence. Adaptée de (Banuls, Hide et Prugnolle 2007).

3.1. Leishmanioses

3.1.1. Formes cliniques

La leishmaniose se présente sous trois principales formes cliniques, selon l'espèce contractée: la leishmaniose cutanée, la leishmaniose mucocutanée (aussi connue sous le nom de *espundia*) et la leishmaniose viscérale (ou *kala-azar*, nom hindou pour « fièvre noire »). La leishmaniose cutanée, causée entre autres par *L. major*, *L. mexicana* et *L. tropica*, est de loin la forme la plus répandue. En effet, l'OMS estime à 1-1,5 millions le nombre de nouveaux cas de leishmaniose cutanée par année. La majorité de ces cas (plus de 90%) sont concentrés en Afghanistan, au Brésil, en Iran, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie (Desjeux 2004). La leishmaniose cutanée se caractérise par l'apparition au niveau du site d'infection d'ulcères ou de nodules sur la peau qui guérissent généralement

spontanément, mais qui peuvent laisser après régression des cicatrices défigurantes. En revanche, la leishmaniose mucocutanée, dont l'agent causal le plus répandu est *L. braziliensis*, touche principalement le Nouveau Monde. Les patients qui en sont atteints souffrent de lésions destructives au niveau des muqueuses du nez et de la bouche, descendant jusqu'au pharynx et au larynx. Les cas de décès sont souvent dus à la malnutrition ou aux infections secondaires opportunistes.

La leishmaniose viscérale, engendrée notamment par *L. donovani*, *L. infantum* et *L. chagasi*, est la forme la plus grave de la maladie et afflige 500 000 nouveaux individus à chaque année. Plus de 90% des cas surviennent en Inde, au Bangladesh, au Népal, au Soudan et au Brésil (Desjeux 2004). La leishmaniose viscérale est une infection chronique qui affecte les organes internes, principalement le foie, la rate, les ganglions et la moëlle osseuse, et dont le taux de fatalité en l'absence de traitement peut atteindre 100% dans certains pays. L'OMS estime d'ailleurs à plus de 50 000 le nombre annuel de décès, un taux surpassé seulement par le paludisme parmi les maladies causées par les parasites (Chappuis *et al.* 2007). Les principaux symptômes incluent une lente poussée de fièvre, de l'anémie, une hépatosplénomégalie et une perte de poids. Suite aux traitements, certains patients développent la leishmaniose dermique post-kala-azar (PKDL), une complication qui se manifeste par un érythème morbilliforme. On retrouve surtout la PKDL au Soudan, et parfois dans les régions de l'Est de l'Afrique et en Inde.

3.1.2. Diagnostic et traitement

Bien que les manifestations cliniques de la leishmaniose cutanée ou mucocutanée soient parfois suffisamment caractéristiques pour permettre le diagnostic de la maladie, celles de la leishmaniose viscérale sont en revanche peu spécifiques. De façon générale, des analyses en laboratoire doivent être effectuées afin de confirmer le diagnostic de l'infection. Les méthodes classiques incluent l'identification des promastigotes en culture et de la forme amastigote par l'examen microscopique de frottis de lésions cutanées ou de biopsies de rate, de ganglions ou de moëlle osseuse, bien que ces méthodes soient très invasives et peuvent engendrer de sévères hémorragies. Plusieurs autres techniques moléculaires et sérologiques sont maintenant disponibles de façon centralisée, permettant

l'analyse de l'ADN du kinétopaste ou des isoenzymes et la détection d'antigènes de *Leishmania* ou d'anticorps spécifiques (Salman, Rubeiz et Kibbi 1999; Chappuis *et al.* 2007). Ces tests permettent parfois même de détecter une infection asymptomatique chez les individus en santé ou des infections antérieures.

Il n'existe présentement aucun vaccin ou autre mesure prophylactique efficace contre la leishmaniose et les traitements thérapeutiques disponibles sont limités par leur toxicité élevée, le besoin d'hospitalisation pour leur administration, leur coût onéreux et/ou l'émergence de résistance chez le parasite ou les insectes vecteurs. Les dérivés de l'antimoine pentavalent furent des traitements de première ligne pendant plus de 70 ans, malgré leurs effets secondaires dangereux. Ils furent éventuellement remplacés par l'amphotéricine B dans certaines régions comme l'Inde, où le taux d'échec de traitement par les antimoniaux a atteint plus de 60% (Sundar *et al.* 2000). La miltéfosine, le seul traitement oral efficace contre la leishmaniose viscérale, a démontré un taux d'efficacité de 82% dans des essais cliniques de phase IV effectués en Inde (Bhattacharya *et al.* 2007). Enfin, la paromomycine, un antibiotique aminoglycoside découvert dans les années 1960 et réintroduit par l'Institut pour la santé mondiale comme traitement potentiel contre la leishmaniose, a également eu des résultats prometteurs lors d'une étude clinique en Inde et serait bon marché (Sundar *et al.* 2007).

Les maladies orphelines et négligées, causées par les parasites tropicaux tels que *Leishmania*, *Schistosoma*, *Trypanosoma*, etc., affectent principalement les pays en voie de développement, et ainsi une population essentiellement pauvre. En raison de leur manque de rentabilité, peu d'attention est accordée par les pays industrialisés au développement de nouveaux traitements prophylactiques ou thérapeutiques contre ces parasites. Malgré que cette situation puisse changer en raison de l'incidence croissante des cas de co-infection avec le virus de l'immunodéficience humain (VIH), il est crucial que de plus amples recherches soient effectuées sur la pathogenèse des agents étiologiques de ces maladies afin d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le développement d'un vaccin ou d'un traitement.

3.2. Cycle de vie

Les leishmanies sont des parasites biphasiques dont le cycle de vie implique deux hôtes : un vecteur arthropode, soit la mouche des sables, et un hôte mammifère tel que l'humain, les rongeurs et les canidés (Fig. 6). Chez le vecteur, *Leishmania* se retrouve sous le stade promastigote, la forme extracellulaire du parasite qui se caractérise par la présence d'un flagelle et sa morphologie allongée (10 à 20 µm en longueur, incluant le flagelle, par 1,5 à 3 µm en largeur). Chez le mammifère, *Leishmania* est un parasite intracellulaire obligatoire des cellules du système réticulo-endothélial, principalement les macrophages mais aussi les cellules dendritiques, les monocytes et les neutrophiles, où l'infection est perpétuée par le stade amastigote, non motile et de forme ovoïde (2 à 3 µm de diamètre).

En prenant un repas sanguin, une mouche des sables femelle infectée inocule par la même occasion une faible quantité de promastigotes infectieux chez le mammifère, qui atteignent la circulation sanguine, deviennent opsonisés par les composantes du sérum et sont ensuite phagocytés par les macrophages via divers récepteurs tels que le récepteur 3 du complément (CR3) et les récepteurs du fragment Fc des Ig (FcR) (Mosser et Edelson 1985; Guy et Belosevic 1993; Mosser et Rosenthal 1993; Kima *et al.* 2000). Au cours des 24 à 72 heures suivantes, les promastigotes se différencient en amastigotes, qui résident et prolifèrent au sein d'une vacuole parasitophore présentant les propriétés caractéristiques du phagolysosome (pH acide autour de 5.5, présence d'enzymes digestives, etc.) (Antoine *et al.* 1990; Lang *et al.* 1994; Antoine *et al.* 1998). La prolifération du parasite entraîne éventuellement la rupture de la cellule-hôte, libérant ainsi les amastigotes qui infectent les phagocytes avoisinants. Le cycle de vie est complété lorsqu'une nouvelle mouche des sables prenant un repas sanguin ingère des cellules infectées et des amastigotes libres. Dans le tube digestif de l'arthropode, les amastigotes se transforment en promastigotes procycliques, une forme non infectieuse se divisant rapidement, et ceux-ci s'attachent à l'épithélium de l'intestin moyen de l'insecte afin d'éviter d'être excrétés. Les parasites acquièrent leur virulence au cours d'un processus nommé métacyclogenèse, par lequel les promastigotes procycliques se différencient en promastigotes métacycliques infectieux

mais qui ne se divisent plus. Simultanément, le parasite se détache de l'épithélium de l'intestin moyen et amorce sa migration vers l'extrémité antérieure du tractus digestif.

La différenciation des amastigotes en promastigotes, et vice versa, s'accompagne de modifications majeures au niveau des molécules de virulence à la surface du parasite. Les promastigotes expriment plusieurs glycoconjugués membranaires et sécrétés, tels que le lipophosphoglycan (LPG), la protéase gp63, la phosphatase acide, les phospholipides glycosylinositols (GIPL) et le protéophosphoglycan (PPG), qui forment un glycocalyx dense autour du parasite (7 nm d'épaisseur chez les promastigotes procycliques, >17 nm chez les métacycliques) (Mukhopadhyay et Mandal 2006). L'expression de certains d'entre eux, notamment le LPG et la gp63, est fortement diminuée, voire complètement abolie chez l'amastigote (Medina-Acosta *et al.* 1989; McConville et Blackwell 1991; Pimenta, Saraiva et Sacks 1991; Turco et Sacks 1991; Schneider *et al.* 1992).

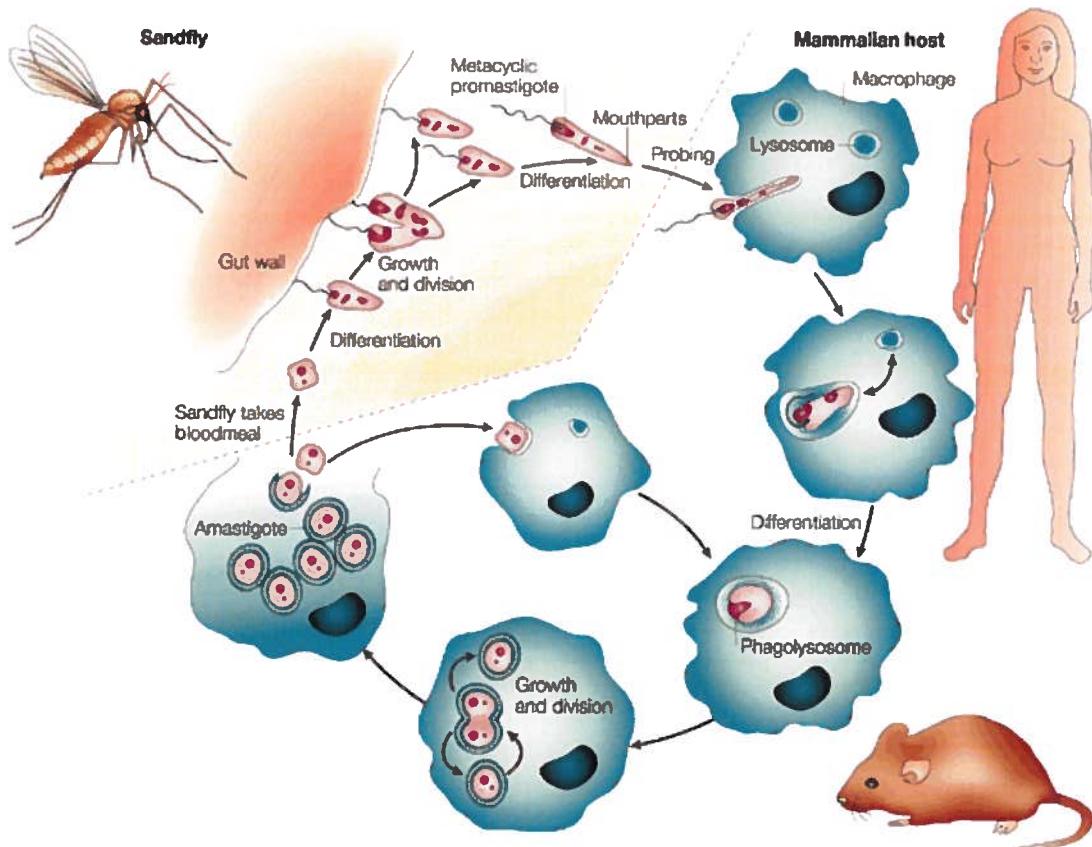


Figure 6 : Cycle de vie de *Leishmania*.

Le parasite *Leishmania* est transmis à l'hôte mammifère par une mouche des sables

infectée lors d'un repas sanguin, où une petite quantité de promastigotes infectieux est injectée. Suite à leur opsonisation par les composantes du sérum, les promastigotes sont internalisés par le macrophage, où ils se transforment en amastigotes, qui se répliquent et prolifèrent dans le phagolysosome de la cellule. Le cycle de vie est complété lorsqu'une mouche des sables prend un nouveau repas sanguin, et ingère des macrophages infectés ainsi que des parasites libres. Au cours d'un processus nommé métacyclogenèse, les amastigotes se transforment en promastigotes au sein du tractus digestif et acquièrent leur caractère infectieux. (Sacks et Noben-Trauth 2002)

4. INTERACTIONS *LEISHMANIA*-MACROPHAGE

Afin d'établir une infection intracellulaire productive, *Leishmania* doit à tout prix empêcher l'activation du macrophage causée par la reconnaissance du parasite lors de son internalisation ainsi que celle induite par les cytokines du système immunitaire et autres stimuli externes. *Leishmania* a donc développé de nombreuses stratégies afin d'inhiber les voies de signalisation menant à l'activation de mécanismes microbicides chez sa cellule-hôte (Bogdan et Rollinghoff 1998; Lodge et Descoteaux 2005b; Olivier, Gregory et Forget 2005; Kima 2007). L'attachement de *Leishmania* au macrophage via le CR3 est un choix judicieux car la liaison de ce récepteur n'induit pas de flambée oxidative (Mosser et Edelson 1987). L'internalisation subséquente du parasite par un macrophage naïf, dans le cas des promastigotes de *L. donovani*, s'effectue de manière silencieuse, en l'absence d'activation des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) p38, p44/42 et JNK (kinase c-Jun N-terminale) et du facteur nucléaire κB (NF-κB) (Privé et Descoteaux 2000). Similairement, les amastigotes de *L. mexicana* n'engendrent pas la maturation des cellules dendritiques et leur entrée chez ces cellules a donc également été qualifiée de silencieuse (Bennett *et al.* 2001). Une fois internalisé, *Leishmania* affecte de nombreux processus impliqués dans la destruction des microbes (Sections 4.1 et 4.2) et empêche l'activation de sa cellule-hôte par les stimuli externes tels que le LPS (Descoteaux et Matlashewski 1989; Descoteaux *et al.* 1991; Ghosh *et al.* 2001; Ghosh *et al.* 2002; Dey *et al.* 2007) et l'IFN-γ (Section 4.3).

4.1. Modulation de la biogenèse du phagolysosome

Le stade amastigote de *Leishmania* résiste aisément aux conditions hostiles du phagolysosome : son métabolisme, par exemple, est adapté aux environnements acides (Mukkada *et al.* 1985). En revanche, le promastigote en est plus vulnérable et doit donc retarder la maturation du phagosome suite à son internalisation jusqu'à sa différenciation en amastigote. Les promastigotes de *L. donovani* et *L. major* inhibent via le LPG la fusion du phagosome avec les endosomes tardifs et les lysosomes, en induisant la rétention de la machinerie responsable de la polymérisation de l'actine et ainsi l'accumulation prolongée d'une couche d'actine périphagosomale (Desjardins et Descoteaux 1997; Scianimanico *et al.* 1999; Dermine *et al.* 2000; Holm *et al.* 2001; Lodge et Descoteaux 2005a, 2005b). De plus, l'insertion du LPG au sein des radeaux lipidiques du phagosome altère leur intégrité (Chakraborty *et al.* 2005; Dermine *et al.* 2005; Winberg *et al.* 2009) et empêche le recrutement de la PKC- α , impliquée dans la dépolymérisation de l'actine (Holm *et al.* 2001; Holm *et al.* 2003), ainsi que de régulateurs de fusion membranaire tels que la Synaptotagmine-V (Vinet *et al.* 2009).

4.2. Inhibition des fonctions antimicrobiennes du macrophage

4.2.1. Suppression de la production de RNI et ROI

L'oxyde nitrique joue un rôle crucial dans la destruction de *Leishmania* (Green *et al.* 1990; Liew *et al.* 1990; Liew *et al.* 1991; Assreuy *et al.* 1994; Wei *et al.* 1995; Murray et Nathan 1999; Mukbel *et al.* 2007), et de nombreuses espèces telles que *L. donovani*, *L. mexicana* et *L. amazonensis* inhibent l'expression ou l'activité de l'iNOS afin d'empêcher sa production et ainsi assurer leur survie intracellulaire (Melby *et al.* 2001; Balestieri *et al.* 2002; Qadoumi *et al.* 2002). La production de ROI, dont l'importance pour le contrôle des infections par *Leishmania* varie selon l'espèce (Murray et Nathan 1999; Blos *et al.* 2003; Mukbel *et al.* 2007), est également abolie chez les cellules infectées par *L. donovani*, *L. major* et *L. pifanoi* (Buchmüller-Rouiller et Mauël 1987; Olivier, Baimbridge et Reiner 1992; Olivier, Brownsey et Reiner 1992; Pham, Mouriz et Kima 2005). Les stades promastigote et amastigote de *L. donovani* inhibent l'assemblage de la

NADPH oxydase en bloquant la phosphorylation ou le recrutement des composantes cytosoliques à la membrane du phagosome (Lodge et Descoteaux 2006; Lodge, Diallo et Descoteaux 2006).

4.2.2. Blocage de la présentation antigénique via le CMH II

Le processus de présentation antigénique via le CMH de classe II est défectueux chez les cellules infectées par *Leishmania* (Kima *et al.* 1996; Prina *et al.* 1996; Courret *et al.* 1999; Gregory et Olivier 2005). Les stratégies par lesquelles *Leishmania* interfère avec ce processus varient selon l'espèce et le stade de vie. Par exemple, les amastigotes de *L. amazonensis* et de *L. mexicana* internalisent et dégradent les molécules de CMH II (De Souza Leao *et al.* 1995; Antoine *et al.* 1999), alors que les promastigotes de *L. major* semblent bloquer le chargement des antigènes sur les molécules de classe II (Fruth, Solioz et Louis 1993). Les promastigotes de *L. donovani* engendrent une perturbation des radeaux lipidiques, structures importantes pour le trafic des molécules du CMH II jusqu'à la membrane plasmique (Chakraborty *et al.* 2005; Rodgers et Smith 2005). Les deux stades de cette espèce préviennent également l'expression de la molécule co-stimulatrice B7.1 (Kaye *et al.* 1994; Saha *et al.* 1995). Par conséquent, l'activation des lymphocytes T CD4⁺ par les macrophages infectés par *Leishmania* est anormale (Prina *et al.* 1993; Kima *et al.* 1996; Courret *et al.* 1999; Meier, Svensson et Kaye 2003).

4.2.3. Modulation de la production de cytokines

Leishmania prévient également l'activation du système immunitaire en bloquant la production par le macrophage de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-1 β (Reiner 1987; Descoteaux et Matlashewski 1989; Reiner *et al.* 1990), et de cytokines impliquées dans l'activation des lymphocytes T, comme l'IL-12 (Carrera *et al.* 1996; Belkaid, Butcher et Sacks 1998; Weinheber *et al.* 1998). En revanche, *Leishmania* stimule la sécrétion de molécules immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le facteur de croissance transformant (TGF)- β (Bogdan et Rollinghoff 1998).

4.3. Inhibition de la réponse à l'IFN- γ

4.3.1. Suppression de l'expression génique induite par l'IFN- γ

Leishmania modifie grandement le patron d'expression génique basal et inductible par l'IFN- γ du macrophage, notamment au niveau des gènes impliqués dans l'immunité, la transduction du signal, la transcription et la synthèse des protéines (Rodriguez, Chang et Wilson 2004; Dogra, Warburton et McMaster 2007). Par exemple, les promastigotes de *L. chagasi* empêche l'induction du CMH II en réponse à l'IFN- γ chez les macrophages et les monocytes (De Almeida, Cardoso et Barral-Netto 2003). Similairement, le blocage de l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ chez les macrophages infectés par le stade amastigote de *L. donovani* s'effectue au niveau transcriptionnel (Reiner, Ng et McMaster 1987; Reiner *et al.* 1988). Le mécanisme sous-jacent de cette inhibition, qui semble être indépendant de l'AMPc (Kwan *et al.* 1992), a toutefois été peu étudié.

L'infection du macrophage par les amastigotes de *L. donovani* inhibe également l'expression de la protéine iNOS en réponse à l'IFN- γ (Nandan, Lo et Reiner 1999). Il demeure cependant inconnu si ce blocage s'effectue au niveau de la transcription.

4.3.2. Inhibition de la signalisation de l'IFN- γ via la voie JAK-STAT1

Comme plusieurs autres microbes intracellulaires, l'inhibition de la signalisation via la voie JAK-STAT1 en réponse à l'IFN- γ est une des principales stratégies exploitées par *Leishmania* afin d'empêcher l'activation des fonctions microbicides du macrophage (Tableau 2). Ainsi, les promastigotes de *L. major* et *L. mexicana* inhibent l'expression de IFN γ R α/β et de JAK1/2 chez le macrophage (Bhardwaj *et al.* 2005) et engendrent la dégradation de STAT1 α via le protéasome (Forget, Gregory et Olivier 2005). Les promastigotes de *L. mexicana* stimulent aussi la phosphorylation du dominant négatif STAT1 β (Bhardwaj *et al.* 2005). En revanche, les amastigotes de *L. amazonensis* inhibent la phosphorylation de STAT1 α chez les cellules dendritiques (Xin, Li et Soong 2008).

Le blocage des réponses à l'IFN- γ par *L. donovani* semble également découler d'une interférence avec la transduction du signal via la cascade JAK-STAT1. L'infection de monocytes ou de macrophages par la forme promastigote de *L. donovani* bloque l'expression de IFN γ R α (Ray *et al.* 2000), inhibe la phosphorylation de JAK2 (Blanchette *et al.* 1999), et engendre la dégradation de STAT1 α par le protéasome (Forget, Gregory et Olivier 2005). Les protéines tyrosine phosphatases semblent jouer un rôle majeur dans la progression de l'infection par *Leishmania* et le développement de la leishmaniose (Olivier *et al.* 1998; Forget *et al.* 2001; Nandan et Reiner 2005). L'activation de SHP-1 par le stade promastigote de *L. donovani* est responsable de l'inactivation de JAK2 et de l'inhibition de la production de NO, en plus d'induire une déphosphorylation générale des résidus tyrosine du macrophage (Blanchette *et al.* 1999; Forget *et al.* 2006). Similairement, les promastigotes de *L. donovani* stimulent l'expression d'un autre régulateur négatif de la signalisation de l'IFN- γ via la voie JAK-STAT1, soit SOCS3, empêchant ainsi l'activation de STAT1 α (Bertholet *et al.* 2003). De toute évidence, peu de temps après l'initiation de l'infection intracellulaire, les promastigotes de *L. donovani* engendrent une suppression efficace de la cascade de signalisation prédominante de l'IFN- γ , un des plus puissants activateurs du macrophage.

Contrairement à sa forme promastigote, peu d'attention a été accordée à l'impact du stade amastigote de *L. donovani* sur la signalisation de l'IFN- γ via la cascade JAK-STAT1. Selon des études effectuées chez les monocytes, les amastigotes de *L. donovani* semblent inhiber la phosphorylation et ainsi l'activation de JAK1/2 et de STAT1 (Nandan et Reiner 1995; Ray *et al.* 2000). Toutefois, aucune étude n'a été effectuée chez la principale cellule-hôte de *Leishmania*, le macrophage. L'acquisition de ces connaissances est cruciale pour le développement de nouvelles approches prophylactiques et thérapeutiques contre les leishmanioses, étant donné le rôle central du stade amastigote dans la progression de la maladie et l'induction de la pathologie.

L'objectif principal de ce projet de recherche était donc d'analyser l'impact des amastigotes de *L. donovani* sur la signalisation de l'IFN- γ via la cascade JAK-STAT1, en comparaison avec l'infection par le stade promastigote, afin d'élucider le mécanisme

d'inhibition de la production de NO et de l'expression du CMH II et d'éclaircir les stratégies exploitées par le parasite pour échapper au système immunitaire.

ARTICLE

***Leishmania donovani* amastigotes impair IFN- γ -induced STAT1 α
nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1 α and
importin- α 5**

Christine Matte and Albert Descoteaux*

INRS-Institut Armand-Frappier and Centre for host-parasite interactions, Laval, QC,
Canada H7V 1B7

*Corresponding author:

Albert Descoteaux
INRS-Institut Armand-Frappier
531, boul. des Prairies
Laval, QC
Canada H7V 1B7

Phone: (450) 687-5010 ext. 4465
FAX: (450) 686-5301
albert.descoteaux@iaf.inrs.ca

Running title: *Leishmania* blocks STAT1 α -importin- α 5 interaction

ABSTRACT

Our knowledge of the strategies utilized by amastigotes of the protozoan parasite *Leishmania donovani* to impair macrophage responsiveness to IFN- γ is fragmentary. In the present study, we have investigated the impact of *L. donovani* amastigote infection on IFN- γ signaling in mouse bone marrow-derived macrophages. IFN- γ -induced expression of MHC II, the type IV Class II transactivator, and the inducible nitric oxide synthase was strongly reduced in amastigote-infected macrophages. As expression of those genes is mediated by the transcription factors STAT1 α and IRF-1, we investigated their activation in *L. donovani* amastigote-infected macrophages treated with IFN- γ . We found that whereas STAT1 α protein levels and phosphorylation on Tyr701 and Ser727 were normal, IRF-1 expression was inhibited in infected macrophages. This inhibition of IRF-1 expression correlated with a defective nuclear translocation of STAT1 α , and further analyses revealed that IFN- γ -induced STAT1 α association with the nuclear transport adaptor importin- α 5 was compromised in *L. donovani* amastigote-infected macrophages. Taken together, our results provide evidence for a novel mechanism used by *L. donovani* amastigotes to interfere with IFN- γ -activated macrophage functions and provides a better understanding of the strategies deployed by this parasite to ensure its intracellular survival.

INTRODUCTION

Protozoan parasites of the genus *Leishmania* cause a spectrum of diseases in humans, ranging from self-healing ulcers to potentially fatal visceral leishmaniasis, which affect millions of people worldwide. These parasites are transmitted to mammals under their promastigote form upon the bloodmeal of infected sand flies. Following their phagocytosis by macrophages, promastigotes differentiate into amastigotes, the mammalian stage of the parasite which resides and replicates inside phagolysosomes. To ensure their survival within macrophages, *Leishmania* parasites have evolved strategies to sabotage signaling pathways that modulate host cell microbicidal properties (Descoteaux *et al.*, 1989, Ghosh *et al.*, 2001, Olivier *et al.*, 2005, Lodge *et al.*, 2006, Kima, 2007). Hence, *Leishmania*-infected macrophages are characterized by an abnormal expression of activation-associated functions and by an unresponsiveness to activators such as IFN- γ (Reiner *et al.*, 1987, Reiner *et al.*, 1988, Nandan *et al.*, 1999, Forget *et al.*, 2006, Dogra *et al.*, 2007).

The signaling events initiated by IFN- γ have been investigated in great details (Schroder *et al.*, 2004, Reich *et al.*, 2006). Binding of IFN- γ to its multisubunit receptor triggers tyrosine phosphorylation of the IFN- γ receptor-associated Janus activated kinases (JAK) JAK1 and JAK2, which in turn phosphorylate the transcription factor STAT1 α on Tyr701. Tyrosine-phosphorylated STAT1 α molecules homodimerize and are additionally phosphorylated on Ser727, an important step for full transcriptional activity. STAT1 α homodimers interact with importin- α 5, a member of the karyopherin- α family of nuclear localization signal receptors (Sekimoto *et al.*, 1997, McBride *et al.*, 2002). This interaction with importin- α 5 is central to the nuclear translocation of STAT1 α and the subsequent transcriptional regulation of IFN- γ responsive genes such as IFN regulatory factor 1 (IRF-1) and Class II Transactivator (CIITA), which regulate the expression of genes involved in microbial killing and antigen presentation (such as iNOS and MHC II) (Kamijo *et al.*, 1994, Steimle *et al.*, 1994, Boss, 1997). Studies aimed at understanding the mechanisms by which *L. donovani* impairs IFN- γ -induced macrophage responses revealed that this parasite targets distinct steps along the JAK-STAT pathway. Hence,

within minutes, *L. donovani* promastigotes activate the protein tyrosine phosphatase SHP-1, causing the tyrosine dephosphorylation of JAK2 (Blanchette *et al.*, 1999), and induce proteasome-mediated degradation of STAT1 α (Forget *et al.*, 2005). In addition, *L. donovani* promastigotes down-regulate the IFN- γ receptor α chain protein levels (Ray *et al.*, 2000) and induce transient SOCS3 expression, which negatively regulates IFN- γ signaling (Bertholet *et al.*, 2003). Thus, as they initiate infection, *L. donovani* promastigotes efficiently shut-off the predominant signaling cascade of one of the most important macrophage activator.

Similar to promastigotes, *L. donovani* amastigotes inhibit IFN- γ -induced responses in macrophages, including the expression of MHC II and iNOS (Reiner *et al.*, 1987, Reiner *et al.*, 1988, Nandan *et al.*, 1999). However, the underlying mechanism has not been studied in great details. In the present study, we investigated the impact of *L. donovani* amastigotes on IFN- γ responses and signaling via the JAK-STAT1 pathway. Our findings indicate that infection with *L. donovani* amastigotes caused a down-regulation of IFN- γ -induced gene expression without affecting STAT1 α activation. Rather, amastigotes inhibited IFN- γ -induced STAT1 α nuclear translocation by blocking the interaction of STAT1 α with the karyopherin importin- α 5.

RESULTS

*Inhibition of IFN- γ -induced gene expression by *L. donovani* amastigotes*

To study the mechanism by which *L. donovani* amastigotes inhibit IFN- γ -mediated responses, we first confirmed the impact of *L. donovani* amastigotes on IFN- γ -induced MHC II, CIITA, and iNOS gene expression in bone marrow-derived macrophages (BMM). Consistent with previous reports (Reiner *et al.*, 1987, Reiner *et al.*, 1988), IFN- γ -induced MHC II mRNA levels were significantly reduced in BMM infected for 18 h with *L. donovani* amastigotes compared to uninfected cells (Fig. 1A and B). Similarly, infection of BMM with amastigotes inhibited IFN- γ -induced expression of CIITA through the IFN- γ -responsive promoter IV (type IV CIITA, Fig. 1A and C), indicating that *L. donovani* amastigotes suppress IFN- γ -induced MHC II gene expression by interfering with the expression of CIITA. As was the case for MHC II and CIITA, IFN- γ -induced iNOS expression was significantly inhibited in *L. donovani* amastigote-infected BMM (Fig. 1A and D). Altogether, these results are consistent with the notion that *L. donovani* amastigotes subvert expression of IFN- γ -inducible genes involved in microbe killing and antigen presentation.

L. donovani amastigotes do not induce a general protein tyrosine dephosphorylation

Impairment of IFN- γ -stimulated JAK2 activation by *L. donovani* promastigotes has been associated to the rapid triggering of macrophage SHP-1 activity which resulted in a general dephosphorylation of host protein tyrosyl residues (Blanchette *et al.*, 1999). We therefore examined the impact of *L. donovani* amastigotes on macrophage protein tyrosine phosphorylation. Our results show that infection of BMM with *L. donovani* amastigotes was not accompanied by significant changes in the tyrosine phosphorylation levels of unstimulated and IFN- γ -stimulated cells (Fig. 2). The prominent high molecular weight bands present in infected BMM were previously described as *Leishmania*-derived phosphotyrosine proteins (Nandan *et al.*, 1995, Blanchette *et al.*, 1999, Ray *et al.*, 2000, Forget *et al.*, 2005). Thus, inhibition IFN- γ responses by *L. donovani* amastigotes is unlikely to be the consequence of an activation of protein tyrosine phosphatase(s).

STAT1 levels and phosphorylation are normal in L. donovani amastigote-infected BMM

Previous reports have indicated that *L. donovani* promastigotes inhibit IFN- γ signaling by preventing JAK2 activation and by inducing STAT1 α degradation (Blanchette *et al.*, 1999, Forget *et al.*, 2005). We thus determined whether inhibition of IFN- γ -stimulated gene expression in *L. donovani* amastigote-infected BMM resulted from a disruption of the JAK-STAT1 pathway. Western blot analysis revealed that IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 α on both Tyr701 and Ser 727 was similar in normal and *L. donovani* amastigote-infected BMM, indicating that amastigotes do not interfere with STAT1 α activation (Fig. 3, upper and middle panels). Furthermore, STAT1 α protein levels were not altered by *L. donovani* amastigotes (Fig. 3, bottom panel). Together, these findings indicate that in BMM, inhibition of IFN- γ signaling by *L. donovani* amastigotes occurs downstream of STAT1 α activation.

IFN- γ -induced IRF-1 expression is impaired by L. donovani amastigotes

The transcription factor IRF-1 is among the first genes induced by STAT1 α in response to IFN- γ , and they both act to regulate type IV CIITA and iNOS gene expression (Kamijo *et al.*, 1994, Martin *et al.*, 1994, Meraz *et al.*, 1996, Muhlethaler-Mottet *et al.*, 1998). We thus determined the impact of *L. donovani* amastigotes on IFN- γ -induced IRF-1 expression. In uninfected BMM, IRF-1 was detectable by 1 h post IFN- γ stimulation and was present for at least 6 h (Fig. 4A). On the other hand, infection of BMM with *L. donovani* amastigotes strongly impaired induction of IRF-1 expression by IFN- γ . *Leishmania*-infected macrophages release various immunomodulators which may impair IFN- γ responsiveness (Olivier *et al.*, 2005). To determine whether a secreted immunosuppressive molecule could be responsible for the inhibition of IFN- γ -induced IRF-1 expression in infected BMM, we incubated uninfected BMM with conditioned medium from macrophages infected with *L. donovani* amastigotes and analyzed IFN- γ -induced IRF-1 expression. Figure 4B shows that conditioned medium from infected BMM had no impact on IRF-1 induction by IFN- γ , indicating that mediators released by infected BMM are not responsible for the unresponsiveness to IFN- γ .

L. donovani amastigotes prevent IFN- γ -induced STAT1 α nuclear translocation by blocking STAT1 α association with importin- α 5

The finding that IRF-1 expression was defective in infected BMM led us to verify the possibility that *L. donovani* amastigotes tamper with the ability of activated STAT1 α to translocate to the nucleus and/or to bind DNA. We first assessed by electrophoretic mobility shift assay the levels of active STAT1 α present in nuclear extracts from uninfected and amastigote-infected BMM stimulated with IFN- γ for 15 and 30 min. As shown in Figure 5A, binding of STAT1 α present in nuclear extracts to an oligonucleotide probe containing the γ -activated sequence (GAS) was significantly lower in *L. donovani* amastigote-infected BMM, compared to that observed in uninfected cells. We next examined by confocal immunofluorescence microscopy the distribution of STAT1 α in uninfected and amastigote-infected BMM stimulated with IFN- γ for 15 min. As shown in Figure 5B, the massive nuclear translocation of STAT1 α observed in IFN- γ -stimulated uninfected BMM was strongly inhibited in *L. donovani* amastigote-infected cells.

The transport of STAT1 α from the cytoplasm to the nucleus requires the nuclear transport adaptor importin- α 5 (Sekimoto *et al.*, 1997, McBride *et al.*, 2002). We thus determined whether a defective association between STAT1 α and importin- α 5 could account for the inhibition of IFN- γ -induced STAT1 α nuclear translocation by *L. donovani* amastigotes. To this end, we immunoprecipitated importin- α 5 from uninfected and *L. donovani* amastigote-infected BMM at 15 and 30 min after the addition of IFN- γ and looked for the presence of STAT1 α in the immunoprecipitates. As shown in Figure 6, IFN- γ rapidly increased the levels of STAT1 α present in importin- α 5 immunoprecipitates from uninfected BMM. In contrast, the levels of STAT1 α present in importin- α 5 immunoprecipitates from *L. donovani* amastigote-infected BMM were drastically reduced, both before and after the addition of IFN- γ . These results establish that *L. donovani* amastigotes inhibit the association between STAT1 α and importin- α 5, thereby preventing the nuclear translocation of STAT1 α .

DISCUSSION

The present study was aimed at investigating how *L. donovani* amastigotes interfere with the triggering of IFN- γ -inducible macrophage functions. We report that in BMM, *L. donovani* amastigotes block the nuclear translocation of STAT1 α by preventing its association with the importin- α 5 shuttling receptor.

Alteration of macrophage signaling regulatory machineries is one of the strategies used by the parasite *Leishmania* to avoid activation of microbicidal mechanisms and detection by the host immune system (Olivier *et al.*, 2005, Kima, 2007). Previous studies revealed that *Leishmania* promastigotes use diverse stratagems to efficiently target the JAK2-STAT1 signaling cascade in order to attenuate IFN- γ -inducible macrophage functions (Blanchette *et al.*, 1999, Ray *et al.*, 2000, Bhardwaj *et al.*, 2005, Forget *et al.*, 2005). These include activation of host cell tyrosine phosphatases, inactivation of JAK2 and massive tyrosine dephosphorylation of macrophage proteins, and proteasome-mediated degradation of STAT1 α . In contrast, little is known on the mechanisms by which amastigotes prevent macrophage activation by IFN- γ . This knowledge is crucial for the development of novel prophylactic and therapeutic approaches against leishmaniasis, as the amastigote stage is responsible for disease progression and pathology. As previously reported (Reiner *et al.*, 1987, Reiner *et al.*, 1988), we found that *L. donovani* amastigotes inhibit IFN- γ -induced MHC II expression at the level of gene transcription, which correlated with the inhibition of IFN- γ -induced type IV CIITA gene expression. *L. donovani* amastigotes have also been reported to antagonize induction of iNOS protein expression by IFN- γ in macrophage cell lines (Nandan *et al.*, 1999). Consistently, we observed an inhibition of iNOS gene expression in *L. donovani* amastigote-infected BMM. Expression of both CIITA and iNOS in IFN- γ -activated macrophages is known to depend on the transcription factors STAT1 α and IRF-1 (Kamijo *et al.*, 1994, Martin *et al.*, 1994, Meraz *et al.*, 1996, Muhlethaler-Mottet *et al.*, 1998), leading us to verify the impact of *L. donovani* amastigotes on these two key mediators of IFN- γ responses. In contrast to previous reports (Nandan *et al.*, 1995, Blanchette *et al.*, 1999, Ray *et al.*, 2000,

Forget et al., 2005), we found that *L. donovani* amastigotes neither altered STAT1 protein levels nor prevented STAT1 α Tyr701 and Ser727 phosphorylation. On the other hand, induction of IRF-1 expression was defective in *L. donovani* amastigote-infected BMM. Since IRF-1 expression requires STAT1 α activation, we reasoned that the inhibition of IRF-1 expression in infected BMM may be the consequence of an inability of STAT1 α to either translocate to the nucleus or to bind DNA. Indeed, our findings indicate that *L. donovani* amastigotes block STAT1 α translocation to the nucleus, by abrogating IFN- γ -induced STAT1 α interaction with the nuclear transport adaptor importin- α 5 (see model, Fig. 7).

Previous studies showed that as they initiate infection, *Leishmania* promastigotes activate host cell protein tyrosine phosphatases to efficiently shut-off IFN- γ -activated macrophage microbicidal mechanisms (Blanchette et al., 1999, Ray et al., 2000, Bhardwaj et al., 2005, Forget et al., 2005, Xin et al., 2008). However, given their relatively generalized effect on cellular functions, sustained activation of protein tyrosine phosphatases such as SHP-1 would be detrimental to macrophage survival. Our results indicate that in contrast to promastigotes, *L. donovani* amastigotes act at a very specific step of the JAK-STAT1 signaling cascade, which nevertheless results in an efficient attenuation of IFN- γ -induced MHC II and iNOS expression. This way, amastigotes may replicate in IFN- γ unresponsive macrophages without compromising the short term survival of these cells.

The mechanism by which *L. donovani* amastigotes disrupt the STAT1 α -importin- α 5 association remains to be elucidated. One attractive hypothesis is that a parasite-derived molecule binds and sequesters away activated STAT1 α or importin- α 5. Analogous mechanisms have been described for viruses (Reid et al., 2006, Frieman et al., 2007, Reid et al., 2007). Hence, the Ebola virus VP24 protein specifically binds importin- α 5 within the STAT1 binding region, preventing its interaction with tyrosine phosphorylated STAT1 (Reid et al., 2006, Reid et al., 2007). In the case of the severe acute respiratory syndrome coronavirus, the ORF6 protein inhibits STAT1 nuclear translocation by preventing interactions between the STAT1 α -importin- α 5 complex and the transport

chaperone karyopherin- β 1 (Frieman *et al.*, 2007). However, seclusion of *Leishmania* amastigotes within a parasitophorous vacuole supposes the existence of a mechanism allowing a putative parasite effector to cross the vacuole membrane and to thwart the association of STAT1 α with importin- α 5. Although such a mechanism has not yet been formally described, previous work by Nandan and colleagues revealed that the *Leishmania* EF-1 α is exported to the cytoplasm of infected macrophages, where it may associate with the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (Nandan *et al.*, 2002). Further studies will be required to address this issue. Clearly, disruption of the association between STAT1 α and importin- α 5 by *L. donovani* amastigotes provides a unique system to study the regulation of this association, for which little is currently known.

While the biological implications of Ser727 phosphorylation on STAT1 α transcriptional activity are well characterized (Wen *et al.*, 1995, Decker *et al.*, 2000, Varinou *et al.*, 2003), the underlying mechanism of Ser727 phosphorylation in response to IFN- γ is still poorly understood. Recent studies using immortalized mouse embryonic fibroblasts showed that IFN- γ -induced STAT1 α Ser727 phosphorylation requires prior Tyr701 phosphorylation, nuclear translocation, and stable association of STAT1 α with chromatin (Sadzak *et al.*, 2008). Our observation that *L. donovani* amastigotes interfere with STAT1 α nuclear import without affecting Ser727 phosphorylation suggests that this phosphorylation event occurs in the cytoplasm. A similar observation has been reported by Lüder and colleagues who demonstrated that the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* inhibits IFN- γ -induced STAT1 α nuclear translocation in murine BMM without any impact on STAT1 α Ser727 phosphorylation (Lüder *et al.*, 2001). These discrepancies suggest that distinct mechanisms regulate STAT1 α Ser727 phosphorylation in IFN- γ -stimulated fibroblasts and macrophages.

In conclusion, this study brings to light a novel mechanism exploited by *Leishmania* parasites to disrupt a key signaling cascade associated to macrophage activation, whereby the amastigote stage prevents nuclear translocation of STAT1 α in response to IFN- γ by blocking its interaction with importin- α 5. Identification of the host and parasite

components involved in this inhibition will be crucial to our understanding of *Leishmania* pathogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Macrophage culture

BMM were obtained from the femurs and tibias of 6- to 8-week-old female BALB/c mice (Charles River, St-Constant, Quebec, Canada) and differentiated as previously described (Descoteaux *et al.*, 1989, Privé *et al.*, 2000) in complete medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium with glutamine (Life Technologies, Burlington, ON, Canada), containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA), 10 mM HEPES pH 7.4 and penicillin/streptomycin) supplemented with 15% (v/v) L929 cell-conditioned medium, a source of colony-stimulating factor-1 (CSF-1), in a 37°C incubator with 5% CO₂.

Parasites, infections, and IFN- γ stimulation

Amastigotes of the Ethiopian LV9 strain of *Leishmania donovani* were isolated from the spleen of female HsdHan:AURA hamsters (Harlan Sprague Dawley Inc., Montreal, QC, Canada) infected 6 to 8 weeks earlier with 1.5 × 10⁸ amastigotes by intra-abdominal injection, as previously described (Reiner, 1982). For infections, BMM were incubated at 37°C for 18 h with amastigotes at a parasite-to-macrophage ratio of 20:1. Non-internalized parasites were removed by two washes in serum-free medium and cells were allowed to rest in serum-free medium for one hour after each wash. Infection levels were assessed by microscopic examination of Giemsa stained coverslips (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) placed in some wells. Routinely, over 90% of the BMM were infected with an average of 10 to 15 amastigotes per cell. Recombinant mouse IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was added at 100 U/mL for the indicated time points.

RT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, CA, USA) and reverse transcribed as previously described (Giroux *et al.*, 2003). cDNA was amplified by PCR using the following primer pairs: for MHC II, 5'-*GGAATTCTGGGAATCTCAGGTTCCAGTG-3'* (forward) and 5'-

GGAATTCTAACACCATGCTCAGCCTTG-3' (reverse); for type IV CIITA, *5'-ACAGCCACAGCCGCGACCATA-3'* (forward) and *5'-CTCTGCTCCAATGTGCTCCTA-3'* (reverse); for iNOS, *5'-CCGAAACGCTTCACTTCCAATG-3'* (forward) and *5'-AATCTCTGCCTATCCGTCTCGTC-3'* (reverse); and for HPRT, *5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTGTG-3'* (forward) and *5'-GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC-3'* (reverse). PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.8% (w/v) agarose gel and the pictures were taken with an AlphaImager 3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). For densitometric analysis, the uninfected, IFN- γ -treated sample with the highest band intensity was assigned a value of 1 and all other samples were compared with that baseline value.

Nuclear extracts and EMSA

Adherent BMM (10^7 /dish) were washed once with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and scraped into 1.5 ml of ice-cold PBS. Cell suspensions were transferred into microcentrifuge tubes and pelleted for 15 s at 4°C. Cytoplasm was removed by lysis in hypotonic buffer A (10 mM HEPES pH7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 0.5 mM DTT) containing phosphatase inhibitors (1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1.5 mM EGTA, 10 mM Na₄P₂O₇) and complete protease inhibitors (Roche Applied Science, Laval, QC, Canada) for 10 min on ice followed by addition of 0.5% Nonidet P-40 and vortexing for 10 s. Nuclei were pelleted by centrifugation for 15 s at 4°C and lysed in hypertonic buffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol and 0.5 mM DTT with phosphatase and protease inhibitors). After incubation on ice for 20 min, insoluble material was removed by centrifugation for 2 min at 4°C and protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Nuclear extracts were stored at -70°C. EMSA was performed essentially as described (Giroux *et al.*, 2003), using an oligonucleotide probe containing the consensus GAS sequence recognized by STAT1 (*5'-AGCCATTCCAGGAATCGAAA-3'*). Gels were dried and exposed to an X-ray film at -70°C. Densitometry on digitized scans was performed using an AlphaImager 3400. The uninfected, IFN- γ -treated sample with the

highest band intensity was assigned a value of 1 and all other samples were compared with that baseline value.

Immunoprecipitation and immunoblotting analysis

For immunoblotting experiments, adherent BMM (2×10^6 /well) were washed with ice-cold PBS containing 1 mM Na₃VO₄ and lysed in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EGTA and 1% Triton X-100 with phosphatase and protease inhibitors. After incubation on ice for 10 min, total cell extracts were sonicated, insoluble material was removed by centrifugation for 10 min at 4°C and protein concentrations were determined using the Pierce BCA protein assay. Western blotting was performed as previously described (St-Denis *et al.*, 1998), using rabbit polyclonal antibodies against IRF1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Akt and pTyr701-STAT1 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), STAT1 C-terminus and pSer727-STAT1 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) and mouse monoclonal antibody against phosphotyrosine (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA). For immunoprecipitation analyses, adherent BMM (10^7 /dish) were washed with ice-cold PBS containing 1 mM Na₃VO₄ and lysed in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0 and 1% Nonidet P-40 with phosphatase and protease inhibitors. After incubation on ice for 10 min, lysates were sonicated and insoluble material was removed by centrifugation for 10 min at 4°C. Lysates were cleared for 1 h with recombinant protein G-Sepharose beads (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) at 4°C. After removal of protein G-Sepharose beads by centrifugation, lysates were incubated for 2h at 4°C with 1.5 µg of anti-importin-α5 antibody from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) bound to protein G-Sepharose beads. Immunocomplexes were collected by brief centrifugation, washed three times with lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors, boiled in SDS sample buffer and analyzed by western blotting. Densitometry on digitized scans was performed using an AlphaImager 3400. The uninfected, IFN-γ-treated sample with the highest band intensity was assigned a value of 1 and all other samples were compared with that baseline value. Whenever possible, band intensities were previously normalized with a loading control.

Confocal immunofluorescence microscopy

BMM were seeded in 24-well plates containing microscope coverslips at 1.5×10^5 /well, infected with *L. donovani* amastigotes for 18 h and then stimulated with 100 U/mL IFN- γ for 15 or 30 minutes. Cells were washed in PBS, fixed with 2% PFA for 10 min and then simultaneously blocked and permeabilized in 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 20% normal goat serum, 6% non-fat dry milk and 50% FBS for 20 min at room temperature. STAT1 α distribution was visualized using a mouse anti-STAT1 α (C-terminus) IgG2b antibody from BD Transduction Laboratories at a 1:100 dilution and AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Oregon, USA) at 1:500. Macrophage nuclei and amastigotes were stained with DRAQ5 (BioStatus Ltd., UK) at 1:400. Coverslips were washed three times with PBS and mounted on Fluoromount-G (Interscience, Markham, ON, Canada). Analyses were performed using a Bio-Rad Radiance 2000 confocal imaging system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) installed on an Eclipse E800 microscope. STAT1 translocation was analyzed using an argon/krypton laser at 488 nm with a Plan Apo Nikon 60X (NA 1.4) oil immersion lens. DRAQ5 fluorescence was analyzed using a 638 nm diode laser at 650 nm long-pass with a Plan Apo Nikon 60x (NA 1.4) oil immersion lens. At least 50 cells from each of two independent experiments were examined under each experimental condition. Images were acquired in the normal scanning mode with a Kalman filter of 10 using the LaserSharp software.

REFERENCES

- Bertholet, S., Dickensheets, H.L., Sheikh, F., Gam, A.A., Donnelly, R.P. and Kenney, R.T. (2003). *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun* **71**, 2095-2101.
- Bhardwaj, N., Rosas, L.E., Lafuse, W.P. and Satoskar, A.R. (2005). *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* **35**, 75-82.
- Blanchette, J., Racette, N., Faure, R., Siminovitch, K.A. and Olivier, M. (1999). *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *European journal of immunology* **29**, 3737-3744.
- Boss, J.M. (1997). Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol* **9**, 107-113.
- Decker, T. and Kovarik, P. (2000). Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* **19**, 2628-2637.
- Descoteaux, A. and Matlashewski, G. (1989). c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol* **9**, 5223-5227.
- Dogra, N., Warburton, C. and McMaster, W.R. (2007). *Leishmania major* abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective. *Infect Immun* **75**, 3506-3515.
- Forget, G., Gregory, D.J. and Olivier, M. (2005). Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **280**, 30542-30549.
- Forget, G., Gregory, D.J., Whitcombe, L.A. and Olivier, M. (2006). Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun* **74**, 6272-6279.
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S.A., Palese, P. and Baric, R.S. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *Journal of virology* **81**, 9812-9824.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Das, S., Raha, S., Maulik, N., Das, D.K., et al. (2001). Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania*

- donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. *Mol Cell Biochem* **223**, 47-60.
- Giroux, M., Schmidt, M. and Descoteaux, A. (2003). IFN-gamma-induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C-alpha. *J Immunol* **171**, 4187-4194.
- Kamijo, R., Harada, H., Matsuyama, T., Bosland, M., Gerecitano, J., Shapiro, D., et al. (1994). Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* **263**, 1612-1615.
- Kima, P.E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol* **37**, 1087-1096.
- Lodge, R., Diallo, T.O. and Descoteaux, A. (2006). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* **8**, 1922-1931.
- Lüder, C.G., Walter, W., Beuerle, B., Maeurer, M.J. and Gross, U. (2001). *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *European journal of immunology* **31**, 1475-1484.
- Martin, E., Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994). Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* **180**, 977-984.
- McBride, K.M., Banninger, G., McDonald, C. and Reich, N.C. (2002). Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J* **21**, 1754-1763.
- Meraz, M.A., White, J.M., Sheehan, K.C., Bach, E.A., Rodig, S.J., Dighe, A.S., et al. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* **84**, 431-442.
- Muhlethaler-Mottet, A., Di Bernardino, W., Otten, L.A. and Mach, B. (1998). Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* **8**, 157-166.
- Nandan, D., Lo, R. and Reiner, N.E. (1999). Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* **67**, 4055-4063.
- Nandan, D. and Reiner, N.E. (1995). Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*:

- selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun* **63**, 4495-4500.
- Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C. and Reiner, N.E. (2002). *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J Biol Chem* **277**, 50190-50197.
- Olivier, M., Gregory, D.J. and Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* **18**, 293-305.
- Privé, C. and Descoteaux, A. (2000). *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *European journal of immunology* **30**, 2235-2244.
- Ray, M., Gam, A.A., Boykins, R.A. and Kenney, R.T. (2000). Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* **181**, 1121-1128.
- Reich, N.C. and Liu, L. (2006). Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* **6**, 602-612.
- Reid, S.P., Leung, L.W., Hartman, A.L., Martinez, O., Shaw, M.L., Carbonnelle, C., et al. (2006). Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *Journal of virology* **80**, 5156-5167.
- Reid, S.P., Valmas, C., Martinez, O., Sanchez, F.M. and Basler, C.F. (2007). Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1. *Journal of virology* **81**, 13469-13477.
- Reiner, N.E. (1982). Host-parasite relationship in murine leishmaniasis: pathophysiological and immunological changes. *Infect Immun* **38**, 1223-1230.
- Reiner, N.E., Ng, W., Ma, T. and McMaster, W.R. (1988). Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4330-4334.
- Reiner, N.E., Ng, W. and McMaster, W.R. (1987). Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* **138**, 1926-1932.
- Sadzak, I., Schiff, M., Gattermeier, I., Glintzter, R., Sauer, I., Saalmuller, A., et al. (2008). Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8944-8949.

- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* **75**, 163-189.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. and Yoneda, Y. (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* **16**, 7067-7077.
- St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P., St-Pierre, Y. and Descoteaux, A. (1998). Protein kinase C-alpha modulates lipopolysaccharide-induced functions in a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* **273**, 32787-32792.
- Steimle, V., Siegrist, C.A., Mottet, A., Lisowska-Grospierre, B. and Mach, B. (1994). Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* **265**, 106-109.
- Varinou, L., Ramsauer, K., Karaghiosoff, M., Kolbe, T., Pfeffer, K., Muller, M. and Decker, T. (2003). Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* **19**, 793-802.
- Wen, Z., Zhong, Z. and Darnell, J.E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241-250.
- Xin, L., Li, K. and Soong, L. (2008). Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol* **45**, 3371-3382.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Marcel Desrosiers and Adrien Vinet for their help with confocal immunofluorescence microscopy. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant MOP-12933. CM was supported by studentships from the Canadian Institutes of Health Research and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. AD is the holder of a Canada Research Chair and was a Chercheur-boursier from the FRSQ.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *L. donovani* amastigotes down-regulate IFN- γ -induced antimicrobial gene expression. Adherent BMM were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h at a parasite-to-cell ratio of 20:1, serum-starved for 2 h and then stimulated with 100 U/mL IFN- γ for the indicated times. (A) Total RNA was extracted and analyzed by RT-PCR with specific primers for MHC II, type IV CIITA, iNOS and HPRT as described in *Experimental procedures*. (B-D) Densitometric analyses of relative I-A α (MHC II), type IV CIITA and iNOS levels are shown for one of three independent experiments that yielded similar results.

Figure 2. *L. donovani* amastigotes do not dephosphorylate macrophage protein tyrosyl residues. Adherent BMM were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h at a parasite-to-cell ratio of 20:1 and then stimulated with 100 U/mL IFN- γ for the indicated times. Tyrosine-phosphorylated proteins from whole cell extracts were observed by Western blot using an anti-phosphotyrosine (4G10) antibody as described in *Experimental procedures*. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3. *L. donovani* amastigotes do not alter levels and IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 α . Adherent BMM were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h at a parasite-to-cell ratio of 20:1 and then stimulated with 100 U/mL IFN- γ for the indicated times. Whole cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using antibodies against pTyr701-STAT1, pSer727-STAT1 α and STAT1 α C-terminus as described in *Experimental procedures*. Results are representative of three independent experiments.

Figure 4. Contact-dependent down-regulation of IFN- γ -induced IRF-1 expression by *L. donovani* amastigotes. Adherent BMM were either infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18h at a parasite-to-cell ratio of 20:1 (A, B) or incubated for 5h with the supernatant (Sup.) of infected BMM (B). Cells were then serum-starved for 2h and stimulated with 100 U/mL IFN- γ for the indicated times. Total cell extracts were

analyzed by Western blotting with an antibody against IRF-1 as described in *Experimental procedures*. Densitometric analysis of relative IRF-1 levels is shown for one of three (A) or two (B) independent experiments that yielded similar results.

Figure 5. *L. donovani* amastigotes inhibit nuclear translocation of STAT1 α induced by IFN- γ . BMM were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h at a parasite-to-cell ratio of 20:1, serum-starved for 2h and then stimulated with 100 U/mL IFN- γ for the indicated time points. A. Nuclear extracts were analyzed by EMSA for STAT1 α binding to a GAS consensus oligonucleotide probe (*). C100X, cold probe was added at 100X the concentration of radioactive probe to the reaction mixture of the uninfected, IFN- γ 15 min sample as a competition to verify the specificity of the bands. B. After incubation for 18h in the presence of absence of amastigotes and subsequent treatment with IFN- γ for 15 min, cells were fixed and stained with the DNA marker DRAQ5 (blue) and with anti-STAT1 α C-terminus antibody (green) for immunofluorescence confocal microscopy as described in *Experimental procedures*. Scale bar: 3 μ m.

Figure 6. *L. donovani* amastigotes block STAT1 α association with importin- α 5 in response to IFN- γ . Adherent BMM were infected with freshly isolated *L. donovani* amastigotes for 18 h at a parasite-to-cell ratio of 20:1, serum-starved for 2 h and then stimulated with 100 U/mL IFN- γ for the indicated time points. Total cell extracts were immunoprecipitated using an anti-importin- α 5 antibody as described in *Experimental procedures*. Immune complexes and whole cell extracts (input) were subjected to Western blot analysis using antibodies against STAT1 α C-terminus and importin- α 5. Immunoprecipitated importin- α 5 is hidden by the anti-importin- α 5 antibody heavy chain (IgG). Densitometric analysis of immunoprecipitated STAT1 α levels is shown for one of three independent experiments that yielded similar results.

Figure 7. Proposed model for the *Leishmania donovani* amastigote-mediated inhibition of IFN- γ responses. In uninfected macrophages, IFN- γ binding to its receptor leads to

auto- and trans-phosphorylation of the receptor-associated JAK1 and JAK2, phosphorylation of IFN- γ R α chain, and recruitment, phosphorylation, and dimerization of STAT1 α . Activated STAT1 α dimers are recognized by the transport adaptor importin- α 5 and travel to the nucleus to induce the transcription of IFN- γ -responsive genes, such as IRF-1, type IV CIITA and iNOS. In *L. donovani* amastigote-infected macrophages, IFN- γ -induced signaling events leading to STAT1 α activation are intact; however, the interaction between STAT1 α and importin- α 5 is abrogated, leading to impaired STAT1 α nuclear translocation and impaired transcription of IFN- γ -inducible genes.

Figure 1: *L. donovani* amastigotes down-regulate IFN- γ -induced antimicrobial gene expression.

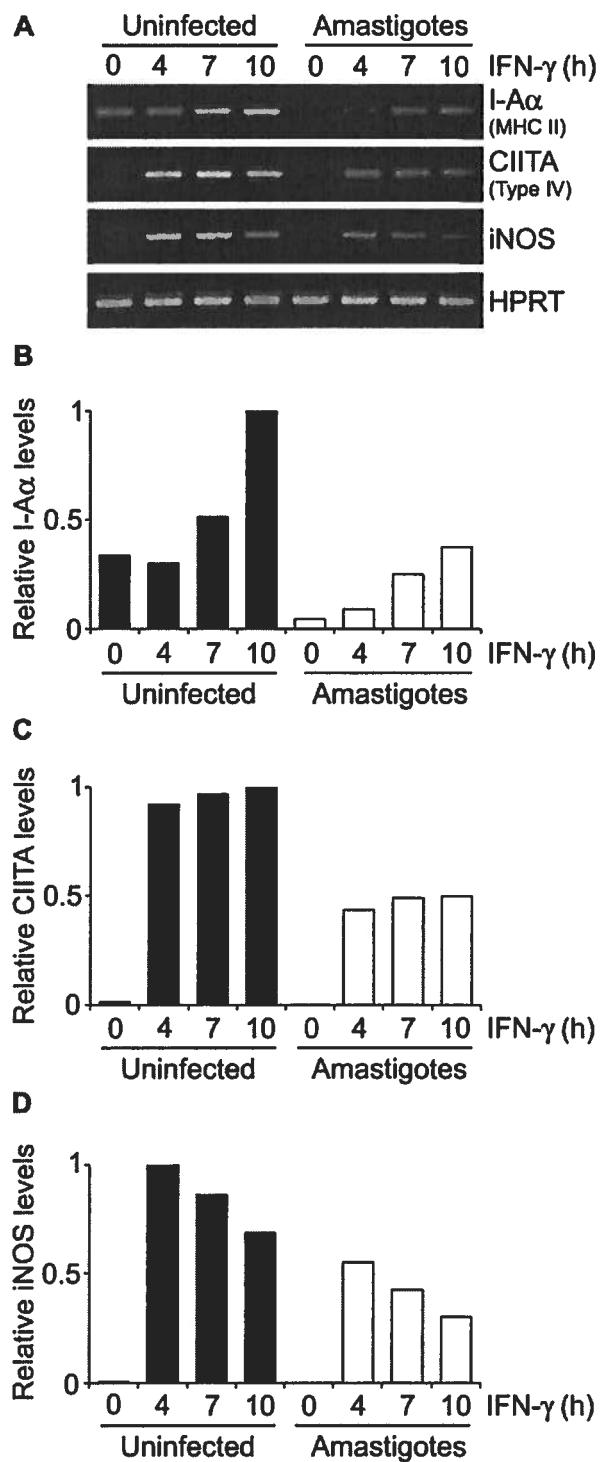


Figure 2. *L. donovani* amastigotes do not dephosphorylate macrophage protein tyrosyl residues.

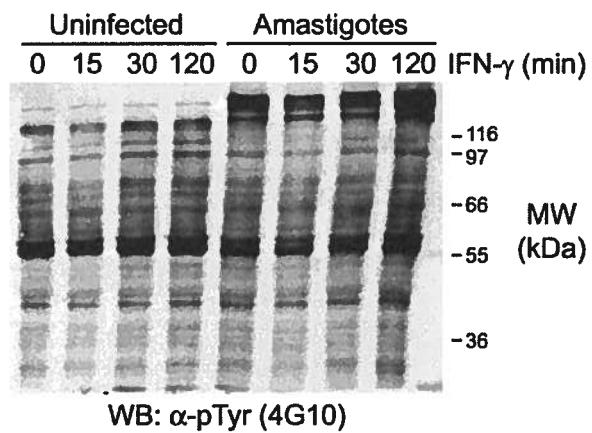


Figure 3. *L. donovani* amastigotes do not alter levels and IFN- γ -induced phosphorylation of STAT1 α .

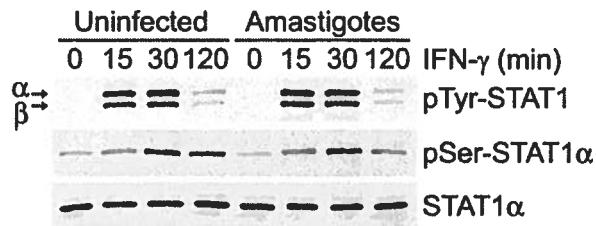


Figure 4. Contact-dependent down-regulation of IFN- γ -induced IRF-1 expression by *L. donovani* amastigotes.

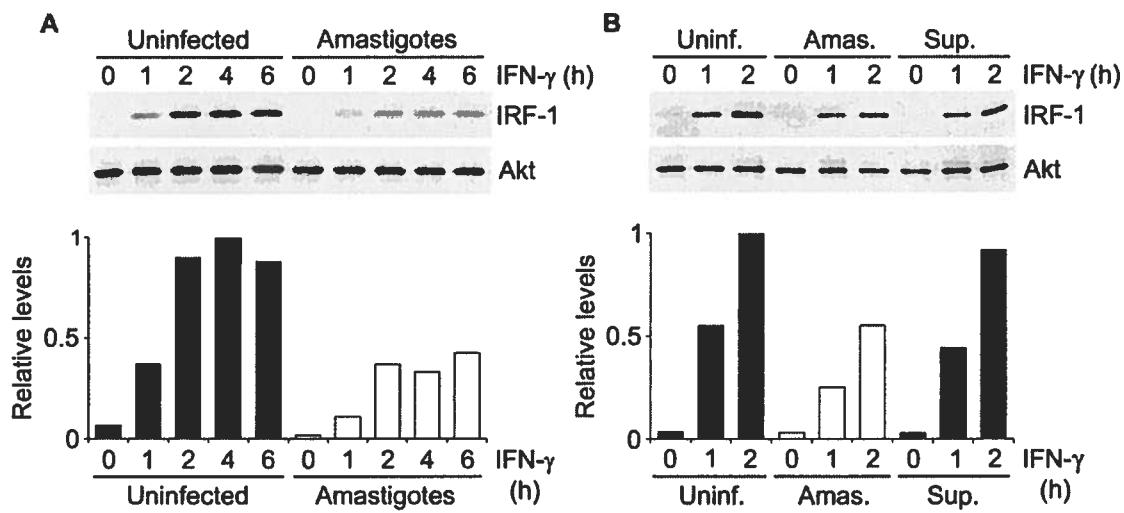


Figure 5. *L. donovani* amastigotes inhibit nuclear translocation of STAT1 α induced by IFN- γ .

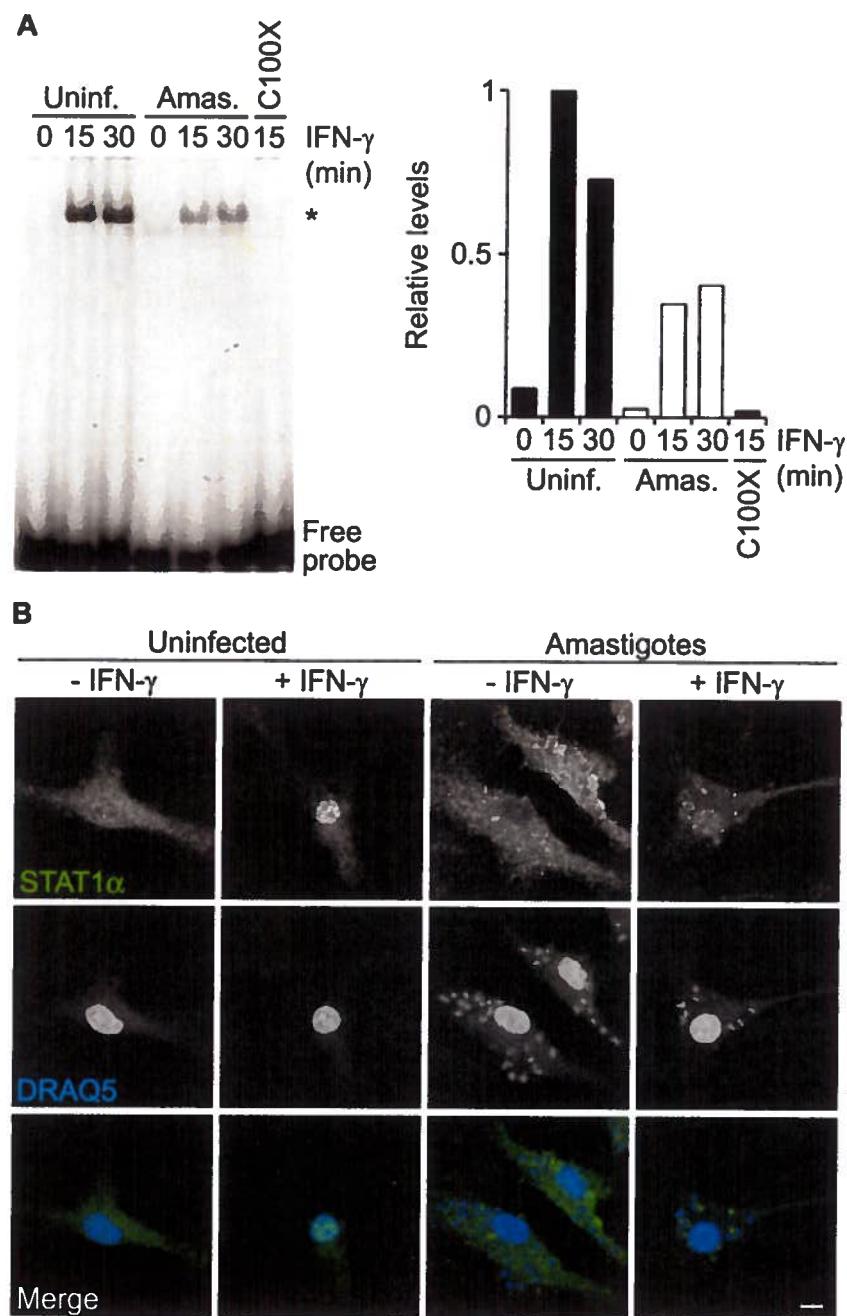


Figure 6. *L. donovani* amastigotes block STAT1 α association with importin- α 5 in response to IFN- γ .

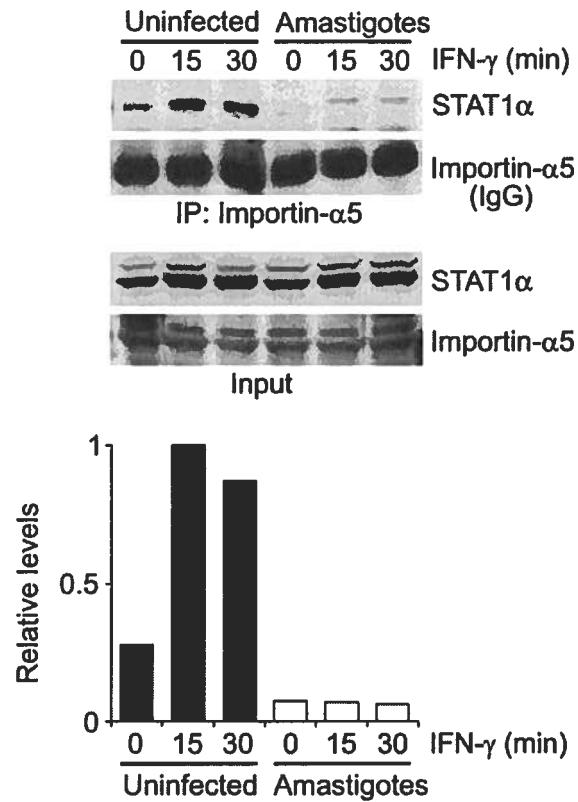
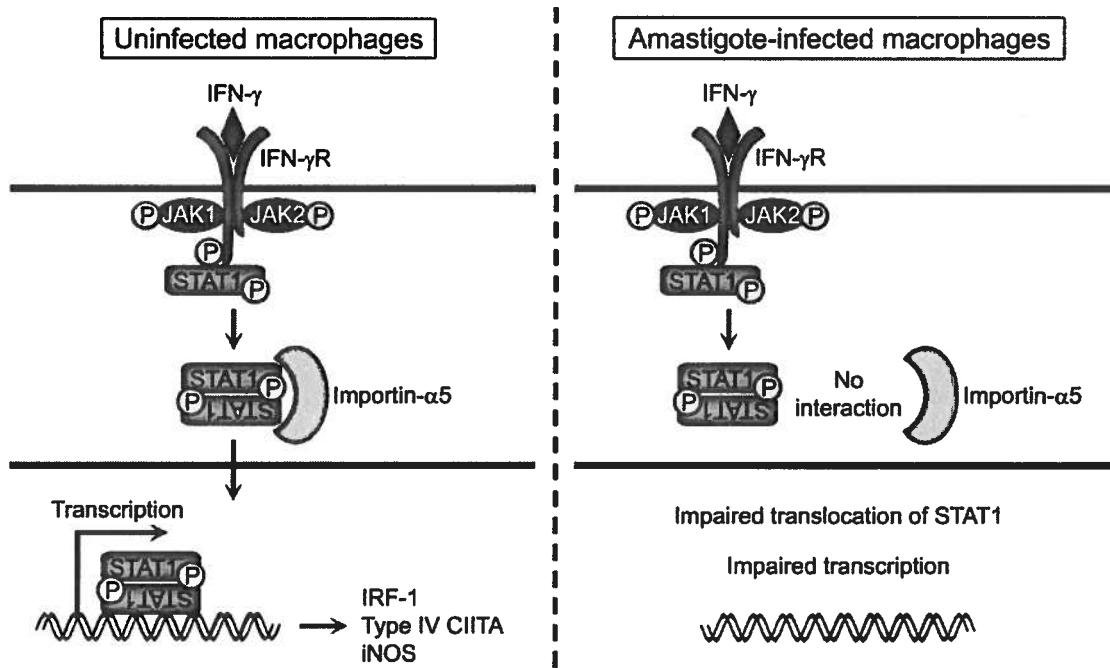


Figure 7. Proposed model for the *Leishmania donovani* amastigote-mediated inhibition of IFN- γ responses.



DISCUSSION

Comme plusieurs agents pathogènes intracellulaires, la survie de *Leishmania* chez le mammifère dépend de sa capacité à inhiber l'induction et l'expansion des lymphocytes CD4⁺ Th1 ainsi que l'activation des fonctions microbicides du macrophage, événements essentiels à l'établissement d'une réponse immunitaire efficace et protectrice contre ce parasite (Solbach et Laskay 2000). L'IFN-γ est un puissant activateur du macrophage et stimule, principalement via la voie JAK-STAT1, l'expression d'une multitude de gènes impliqués par exemple dans la présentation antigénique via les CMH de classe I et II ainsi que dans la production de ROI et de RNI, tels que le superoxyde et le NO (Schroder *et al.* 2004). Afin d'empêcher leur reconnaissance par le système immunitaire et leur destruction, plusieurs espèces de *Leishmania* ont développé des stratégies visant à inhiber la signalisation de l'IFN-γ via la voie JAK-STAT1 et ainsi l'activation des mécanismes antimicrobiens qui en découlent (Olivier, Gregory et Forget 2005; Kima 2007).

Les amastigotes de *L. donovani*, agent étiologique de la leishmaniose viscérale, suppriment l'induction de la transcription du CMH II et de l'expression de l'iNOS par l'IFN-γ (Reiner, Ng et McMaster 1987; Reiner *et al.* 1988; Nandan, Lo et Reiner 1999). Dans le cadre de ce projet, nous avons entrepris d'élucider le mécanisme responsable de cette inhibition, en étudiant l'impact des amastigotes de *L. donovani* sur les réponses transcriptionnelles induites par l'IFN-γ ainsi que la signalisation via la voie JAK-STAT1.

1. Atténuation de l'expression génique induite par l'IFN-γ par les amastigotes de *L. donovani*

L'activation des fonctions antimicrobiennes du macrophage par l'IFN-γ repose sur la transcription de nombreux gènes associés par exemple à la présentation antigénique et à la production de ROI et de RNI. *Leishmania* perturbe ces événements de transcription afin d'assurer sa survie intracellulaire. Ainsi, tel que démontré par des études antérieures (Reiner, Ng et McMaster 1987; Reiner *et al.* 1988), la transcription du gène codant pour la chaîne I-A α du CMH II en réponse à l'IFN-γ est fortement diminuée chez les BMM infectés par le stade amastigote de *L. donovani*. Cette inhibition, dont le mécanisme sous-

jacent était inconnu jusqu'à présent, découle d'une réduction importante de l'expression du CIITA de type IV en réponse à l'IFN- γ .

L'inhibition de l'expression des protéines associées à la présentation antigénique via le CMH II est une stratégie efficace employée par de nombreux agents pathogènes afin d'empêcher l'induction d'une réponse immunitaire adaptative (Accolla *et al.* 2001; Lüder *et al.* 2001; Hussain *et al.* 2008; Saito *et al.* 2008; Roth *et al.* 2009). L'activation des lymphocytes T CD4 $^{+}$ par les macrophages infectés par *L. donovani*, *L. major* ou *L. amazonensis* est anormale (Prina *et al.* 1993; Kima *et al.* 1996; Courret *et al.* 1999; Meier, Svensson et Kaye 2003). Ce phénomène n'a jamais été associé à un défaut au niveau de l'expression des molécules de CMH II à la surface de la cellule-hôte. Pourtant, il a précédemment été démontré que l'inhibition de l'expression des gènes codant pour le CMH II chez des macrophages infectés par le stade amastigote de *L. donovani* corrélait avec une diminution significative de la densité de cette molécule à la surface de la cellule-hôte (Reiner, Ng et McMaster 1987). Afin d'éclaircir les mécanismes par lesquels *L. donovani* échappe au système immunitaire, il serait intéressant d'évaluer si l'atténuation de la transcription de I-A α observée dans le cadre de ce projet est suffisamment importante pour avoir un impact significatif sur l'expression du CMH II au niveau protéique et sur la capacité des macrophages infectés à induire l'activation des lymphocytes T CD4 $^{+}$.

Les amastigotes de *L. donovani* atténuent également la transcription du gène codant pour l'iNOS en réponse à l'IFN- γ , une observation qui concorde bien avec la diminution de la protéine iNOS décrite précédemment (Nandan, Lo et Reiner 1999). Cette observation, ainsi que celles démontrant l'impact du stade amastigote sur l'expression du CMH II et du CIITA de type IV induite par l'IFN- γ , ont été confirmées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel (qPCR) (Appendice A). Enfin, le facteur de transcription IRF-1 est essentiel à l'induction d'une réponse Th1 contre *Leishmania* (Lohoff *et al.* 1997) et dirige la transcription des ISGs, incluant celle du CIITA de type IV et de l'iNOS, en réponse à l'IFN- γ . Les amastigotes de *L. donovani* interfèrent avec l'expression de IRF-1 induite par l'IFN- γ , et ainsi avec l'induction des

protéines impliquées dans la présentation antigénique via le CMH II et la production de NO.

2. Impact des amastigotes de *L. donovani* sur la signalisation via la cascade JAK-STAT1 en réponse à l'IFN- γ

L'abrogation de la transduction du signal via la voie JAK-STAT1 par les agents pathogènes peut s'effectuer à une étape précoce de la cascade, telle que l'activation des JAKs et de STAT1, au moment de la translocation nucléaire de STAT1, au niveau de la transcription, lors de l'inactivation du signal, ou via l'induction de régulateurs négatifs de la cascade (Tableau 2).

2.1. Les évènements précoces de la voie JAK-STAT1 ne sont pas affectés

Des travaux précédents effectués au laboratoire ont démontré que les amastigotes de *L. donovani* n'affectent pas les niveaux cellulaires de JAK2 et sa phosphorylation en réponse à l'IFN- γ chez le macrophage (Giroux 2004). Cette kinase est directement responsable de la phosphorylation de STAT1 α sur son résidu Y⁷⁰¹, évènement essentiel à la dimérisation de STAT1 α , son interaction avec l'importine- α 5 et sa liaison à l'ADN (Shuai *et al.* 1994; Briscoe *et al.* 1996; Sekimoto *et al.* 1997). La phosphorylation de STAT1 α sur ce résidu en réponse à l'IFN- γ se produit adéquatement chez les macrophages infectés par le stade amastigote de *L. donovani*. Cette observation concorde bien avec l'absence d'impact sur l'activation de JAK2 et suggère que les amastigotes de *L. donovani* ne précipitent pas non plus la déphosphorylation de STAT1 α . Nos résultats s'opposent toutefois à une étude par Nandan et collaborateurs, qui ont démontré que l'infection de monocytes humains par le stade amastigote de *L. donovani* entraîne une inhibition de la phosphorylation des JAKs et de STAT1 α en réponse à l'IFN- γ (Nandan et Reiner 1995). Il est possible que ces différences découlent de divergences entre l'humain et la souris, ou entre les monocytes et les macrophages, au niveau des récepteurs cellulaires employés pour l'internalisation du parasite, et ainsi des mécanismes intracellulaires subséquemment activés.

Similairement, les amastigotes de *L. donovani* n'inhibent pas la phosphorylation du résidu S⁷²⁷ de STAT1 α en réponse à l'IFN- γ . Peu d'agents pathogènes intracellulaires sont connus pour inhiber cet évènement de la voie JAK-STAT1, probablement en raison du fait que la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ stimule préférentiellement une sous-population seulement des gènes stimulés par l'IFN- γ . L'induction de l'expression de IRF-1 par l'IFN- γ , par exemple, est presque complètement abolie en son absence, alors que celle de SOCS1 et du CMH I est peu affectée (Wen, Zhong et Darnell 1995; Varinou *et al.* 2003). Pourtant, l'importance de la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ pour le contrôle des infections virales et bactériennes a été clairement définie (Horvath et Darnell 1996; Shuai 2003; Varinou *et al.* 2003).

Les promastigotes de *L. donovani*, ainsi que de nombreux virus, engendrent la dégradation de STAT1 α par le protéasome afin d'empêcher la réponse de leur cellule-hôte aux IFNs (Didcock *et al.* 1999; Garcin, Curran et Kolakofsky 2000; Yokosawa *et al.* 2002; Forget, Gregory et Olivier 2005; Lin *et al.* 2005). Nos résultats démontrent que les amastigotes de *L. donovani*, en revanche, n'ont pas d'effet sur l'expression de STAT1 α , indiquant que la modulation par ce stade du parasite de l'expression génique induite en réponse à l'IFN- γ n'implique pas la dégradation de STAT1 α par le protéasome. De toute évidence, contrairement à plusieurs espèces de *Leishmania* et au stade promastigote de *L. donovani*, les amastigotes de *L. donovani* n'interfèrent donc pas avec les mécanismes culminant à l'activation de STAT1 α .

2.2. Absence d'impact sur les régulateurs négatifs de la cascade JAK-STAT1

Pour plusieurs agents pathogènes, l'inhibition des réponses de leur cellule-hôte à l'IFN- γ découle de l'expression ou l'activation de régulateurs négatifs de la cascade JAK-STAT1 (Tableau 2 de la revue de littérature). Dès les premières minutes de l'infection intracellulaire, les promastigotes de *L. donovani* activent SHP-1 et stimulent l'expression de SOCS3 afin d'empêcher l'induction des fonctions microbicides du macrophage par l'IFN- γ (Blanchette *et al.* 1999; Nandan *et al.* 2002; Bertholet *et al.* 2003; Nandan et Reiner 2005; Forget *et al.* 2006). L'induction de ces protéines par le stade promastigote

engendre l'inhibition de la phosphorylation de JAK2 et de STAT1 α en réponse à l'IFN- γ (Blanchette *et al.* 1999; Bertholet *et al.* 2003). L'absence d'impact des amastigotes de *L. donovani* sur ces évènements de phosphorylation suggère que ce stade n'active pas les PTPs du macrophage et n'indue pas l'expression des SOCS. Bien que cette dernière hypothèse n'ait pas été directement vérifiée dans le cadre de ce projet, nous avons pu démontrer que les amastigotes de *L. donovani* n'engendent pas de déphosphorylation générale des résidus tyrosine du macrophage, conséquence distinctive de l'activation des PTPs. La présence de protéines phosphorylées de haut poids moléculaire chez les extraits de macrophages infectés pourrait laisser croire que les amastigotes induisent à l'inverse une augmentation des évènements de phosphorylation chez la cellule. Toutefois, des résultats précédemment obtenus par l'équipe de Nandan *et al.* suggèrent que ces protéines soient d'origine parasitaire plutôt que cellulaire (Nandan et Reiner 1995).

Le virus syncytial respiratoire (RSV), la bactérie *M. avium* et les promastigotes de *L. mexicana* stimulent l'expression ou la phosphorylation du dominant négatif STAT1 β , qui inhibe l'expression de nombreux gènes en réponse à l'IFN- γ , incluant le CIITA (Alvarez, Zwilling et Lafuse 2003; Bhardwaj *et al.* 2005; Senft *et al.* 2009). Étant donné l'impact des amastigotes de *L. donovani* sur les évènements de transcription induits par l'IFN- γ , il était pertinent de déterminer si une infection par ce stade du parasite engendre une activation accrue de STAT1 β . Nos résultats indiquent que tout comme la phosphorylation de STAT1 α sur Y⁷⁰¹, celle de STAT1 β en réponse à l'IFN- γ n'est pas affectée chez les macrophages infectés par les amastigotes de *L. donovani*.

Il est important de souligner que ces observations, ainsi que celles discutées à la section 2.1, découlent d'expériences effectuées en l'absence d'une étape de sevrage des macrophages en sérum avant la stimulation à l'IFN- γ , contrairement aux autres résultats obtenus dans le cadre de ce projet. Nous avons vérifié que cette divergence de protocole n'a pas d'impact sur les phénomènes observés. En effet, il s'avère que les amastigotes de *L. donovani* atténuent aussi bien l'expression de IRF-1 induite par l'IFN- γ et n'affectent toujours pas la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ lorsque les macrophages sont privés de sérum avant la stimulation.

2.3. Diminution importante de l'import nucléaire de STAT1 α induit par l'IFN- γ

Les multiples mécanismes impliqués dans la translocation, la rétention et l'export nucléaires de STAT1 (ainsi que dans l'induction de la transcription) offrent de nombreuses occasions additionnelles de régulation négative des réponses à l'IFN- γ par le parasite. Nous avons émis l'hypothèse que l'infection des macrophages par le stade amastigote de *L. donovani* pourrait perturber le transport nucléocytoplasmique de STAT1 α , que ce soit via l'inhibition de sa translocation au noyau par l'importine- $\alpha 5$ ou l'accélération de son export vers le cytoplasme par CRM1. Cette dernière possibilité semblait toutefois moins probable, car la déphosphorylation de STAT1 α est indispensable à son export nucléaire par CRM1 (Haspel et Darnell 1999; McBride, McDonald et Reich 2000; Meyer *et al.* 2003). Les résultats obtenus au cours de ce projet démontrent que les amastigotes de *L. donovani* interfèrent en effet avec le processus de translocation de STAT1 α au noyau en réponse à l'IFN- γ , en bloquant son interaction avec la protéine adaptatrice de transport nucléaire importine- $\alpha 5$. La technique de co-immunoprecipitation employée pour analyser l'association de STAT1 α à l'importine- $\alpha 5$ présente toutefois un inconvénient: lors de l'immunobuvardage, l'importine- $\alpha 5$ immunoprecipitée ne peut être distinguée de la chaîne lourde de l'anticorps, car les deux protéines ont le même poids moléculaire. Il serait donc important de confirmer ces observations par une technique alternative, par exemple via l'utilisation de constructions GST.

Néanmoins, un tel mécanisme d'évasion des réponses à l'IFN- γ du macrophage n'a jamais été décrit auparavant chez *Leishmania* et représente donc une découverte intéressante pour la compréhension des stratégies exploitées par *Leishmania* pour assurer sa survie intracellulaire.

3. Spécificité des effets de *Leishmania* sur la voie JAK-STAT1 selon le stade de vie

Le stade promastigote de *Leishmania* inhibe les réponses du macrophage à l'IFN- γ en modulant à plusieurs niveaux la voie JAK-STAT1 et les mécanismes responsables de sa régulation négative. Ainsi, les promastigotes de *L. major* et *L. mexicana* atténuent

l'expression de tous les membres cytoplasmiques de la cascade JAK-STAT1 (IFN γ R α/β , JAK1/2 et STAT1 α) (Bhardwaj *et al.* 2005; Forget, Gregory et Olivier 2005). En plus d'inhiber l'expression de IFN γ R α et de STAT1 α , les promastigotes de *L. donovani* stimulent l'activité des PTPs du macrophage telles que SHP-1, qui ont un effet généralisé sur les fonctions de la cellule (Blanchette *et al.* 1999; Ray *et al.* 2000; Forget, Gregory et Olivier 2005). À l'opposé, l'interruption de la signalisation via la cascade JAK-STAT1 par le stade amastigote de *L. donovani* s'effectue à une étape spécifique, celle de l'interaction STAT1-importine- α 5, mais assure néanmoins une atténuation efficace de l'induction du CMH II et de l'iNOS par l'IFN- γ . Il est possible que cette spécificité reflète les conséquences potentiellement néfastes d'un blocage prononcé et soutenu des fonctions du macrophage par le stade amastigote. De cette façon, les amastigotes créent un environnement propice à leur prolifération intracellulaire sans mettre en danger la survie de leur cellule-hôte.

La majorité des études portant sur l'impact du stade promastigote de *L. donovani* sur l'activation de la voie JAK-STAT1 en réponse à l'IFN- γ ont toutefois été effectuées sur des macrophages immortalisés, dont les réponses ne sont pas toujours représentatives de celles des cellules primaires. Par exemple, le stade amastigote de *L. donovani* atténue l'expression de IRF-1 en réponse à l'IFN- γ chez les BMM, alors que cette expression est intacte chez les macrophages immortalisés de la lignée RAW264.7 (Giroux 2004). Nous avons entrepris de vérifier l'effet des promastigotes de *L. donovani* sur la signalisation via la cascade JAK-STAT1 et les évènements de transcription induits par l'IFN- γ chez les BMM, afin de pouvoir comparer plus judicieusement les mécanismes d'évasion de la réponse à l'IFN- γ par les deux stades du parasite *L. donovani*. Les résultats obtenus chez les BMM divergent considérablement des phénomènes observés chez les macrophages immortalisés (Appendice B). À l'instar des amastigotes, les promastigotes de *L. donovani* diminuent fortement l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ , mais n'affectent que légèrement celle de l'iNOS. L'atténuation de ces évènements, par contre, ne semble pas découler d'une interférence significative avec la cascade JAK-STAT1. Effectivement, chez les BMM, les promastigotes de *L. donovani* n'engendrent pas la dégradation de STAT1 α et n'ont qu'un impact mineur sur son niveau de phosphorylation sur Y⁷⁰¹ et sur

^{S⁷²⁷} 60 minutes suivant la stimulation par l'IFN- γ . Cette diminution n'est d'ailleurs pas suffisamment importante pour empêcher l'expression de IRF-1 et du CIITA de type IV en réponse à l'IFN- γ . Il serait intéressant d'évaluer l'impact des promastigotes de *L. donovani* sur l'expression génique du CIITA de type I en réponse à l'IFN- γ , cette forme étant également impliquée dans la transcription inducible du CMH II chez le macrophage (Waldburger *et al.* 2001; Pai *et al.* 2002). Enfin, l'infection par les promastigotes de *L. donovani* ne semble pas provoquer de déphosphorylation globale des résidus tyrosine des BMM, caractéristique de l'activation des PTPs. Ces divergences marquantes soulignent l'importance d'utiliser des cellules primaires plutôt que des lignées de cellules immortalisées lors d'expériences *in vitro*. Il serait toutefois intéressant de vérifier si des facteurs d'ordre technique contribuent à l'obtention de résultats aussi contradictoires.

Quoi qu'il en soit, les stades promastigote et les amastigote de *Leishmania* ont de toute évidence établi des mécanismes différents d'évasion de la réponse du macrophage à l'IFN- γ . Cette spécificité s'explique possiblement par les différences majeures au niveau des facteurs de virulence présents à leur surface. Par exemple, le LPG domine la surface du promastigote et est responsable de l'inhibition d'une multitude de processus chez le macrophage (Descoteaux et Turco 2002). Son absence chez le stade amastigote permet l'exposition de certains glycoconjugués beaucoup plus petits, comme les GIPL, dont le rôle dans les relations *Leishmania*-macrophage est à ce jour peu connu.

4. Mécanismes potentiels d'inhibition des réponses à l'IFN- γ et de l'interaction de STAT1 α avec l'importeine- α 5 par les amastigotes de *L. donovani*

Nos connaissances sur les processus qui régulent l'association de STAT1 α avec l'importeine- α 5 en réponse à l'IFN- γ sont très limitées. Ceci représente une situation incommodante pour former des hypothèses précises quant au mécanisme par lequel les amastigotes de *L. donovani* interfèrent avec cette interaction et ainsi l'expression génique induite par l'IFN- γ .

4.1. Encombrement stérique ou séquestration par un facteur du parasite

Il est possible qu'un facteur du parasite interagisse avec STAT1 α ou l'importine- $\alpha 5$ et empêche leur association par encombrement stérique (en se liant spécifiquement aux régions impliquées dans leur interaction, c'est-à-dire le dsNLS de STAT1 α et le domaine C-terminal de l'importine- $\alpha 5$) ou par séquestration. Des mécanismes analogues ont été caractérisés chez certains virus. La protéine vacuolaire 24 (VP24) du virus de l'Ébola interagit spécifiquement avec le domaine de liaison de STAT1 α chez l'importine- $\alpha 5$ et bloque donc la reconnaissance de STAT1 α par l'importine- $\alpha 5$ et sa translocation au noyau en réponse à l'IFN- γ (Reid *et al.* 2006; Reid *et al.* 2007). La protéine codée par le sixième cadre de lecture (ORF6) du coronavirus du SRAS, quant à elle, inhibe l'import nucléaire de STAT1 α induit par l'IFN- γ en séquestrant l'importine- $\beta 1$ au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et du Golgi, ce qui prévient son interaction avec le complexe STAT1 α -importine- $\alpha 5$ (Frieman *et al.* 2007). Alternativement, le parasite peut intervenir de manière indirecte avec l'association de STAT1 α à l'importine- $\alpha 5$. Il se peut par exemple que les amastigotes modulent des évènements de signalisation en amont impliqués dans la régulation de la liaison STAT1 α -importine- $\alpha 5$.

La réclusion de *Leishmania* à l'intérieur de la vacuole parasitophore pose toutefois un obstacle de taille à la possibilité d'une interaction directe entre le parasite et STAT1 α , l'importine- $\alpha 5$ ou toute autre composante cytosolique de la cellule. Une telle interaction nécessiterait le relargage ou la sécrétion de facteurs par le parasite et leur transport à travers la membrane de la vacuole jusqu'au cytosol. Les promastigotes de *Leishmania* sécrètent une quantité importante de protéines ayant un rôle potentiel dans la transduction du signal, la modulation des fonctions cellulaires et la survie intracellulaire du parasite (Revest *et al.* 2008; Silverman *et al.* 2008). Par exemple, le facteur d'elongation-1 α (EF-1 α) est sécrété par les promastigotes de *L. donovani* puis exporté vers le cytoplasme des macrophages infectés, où il active la phosphatase SHP-1 et inhibe ainsi les réponses à l'IFN- γ (Nandan *et al.* 2002; Nandan et Reiner 2005). Nous avons donc soulevé l'hypothèse que les amastigotes de *L. donovani* pourraient utiliser un processus actif tel que la sécrétion de facteurs modulatoires afin d'inhiber les réponses à l'IFN- γ .

L'importance de la viabilité des amastigotes de *L. donovani* pour la modulation de l'expression de IRF-1 induite par l'IFN- γ a été évaluée en infectant des macrophages avec des amastigotes vivants ou tués par fixation avec de la formaline (Appendice C). Nos résultats indiquent que les amastigotes morts diminuent aussi fortement l'expression de IRF-1 en réponse à l'IFN- γ que les amastigotes vivants et réfutent donc l'hypothèse d'un mécanisme de sécrétion de molécules par le parasite étant responsable de l'inhibition des réponses à l'IFN- γ par le stade amastigote de *L. donovani*.

4.2. Facteurs de virulence et composantes cellulaires potentiellement impliqués

Il est possible que la reconnaissance de molécules à la surface du parasite par des récepteurs membranaires ou des molécules phagosomales du macrophage active des voies de signalisation qui régulent négativement l'interaction entre STAT1 α et l'importine- $\alpha 5$, et empêche ainsi l'expression des gènes stimulés par l'IFN- γ , tels que IRF-1 et le CMH II. La présence d'anticorps opsonisants à la surface des amastigotes peut par exemple stimuler les récepteurs Fc γ R, dont la liaison par les complexes immuns engendre une inhibition de l'expression du CMH II induite par l'IFN- γ ainsi que la signalisation via la voie JAK-STAT1 (Feldman, Chuang et Finbloom 1995; Barrioueuvo *et al.* 2001; Barrioueuvo *et al.* 2003; Boekhoudt, Frazier-Jessen et Feldman 2007). Aucun impact de ces récepteurs sur la liaison STAT1 α -importine- $\alpha 5$ n'a toutefois été identifié à ce jour. Les GPIL, glycoconjugués membranaires prédominants de la surface des amastigotes, inhibent la production de NO induite par la combinaison IFN- γ /LPS via un mécanisme non identifié (Proudfoot, O'Donnell et Liew 1995) et sont donc des candidats potentiels pour l'inhibition de l'association STAT1 α -importine- $\alpha 5$. Alternativement, l'implication d'un facteur de virulence exprimé uniquement chez les amastigotes, tel que la protéine A2 (Charest et Matlashewski 1994; Zhang *et al.* 1996b), permettrait d'expliquer la spécificité de l'impact des deux stades de *L. donovani* sur la signalisation de l'IFN- γ via la voie JAK-STAT1.

4.3. Production de céramide

Le stade promastigote de *L. donovani* stimule chez le macrophage la synthèse de céramide, une composante lipidique de la sphingomyéline pouvant également agir comme second messager, qui facilite la survie intracellulaire du parasite en altérant diverses voies de signalisation et ainsi la production de NO (Ghosh *et al.* 2001; Ghosh *et al.* 2002; Dey *et al.* 2007). Une étude récente a démontré que la céramide inhibe le processus classique d'import nucléaire en altérant la distribution intracellulaire de la protéine de susceptibilité cellulaire à l'apoptose (CAS), une exportine impliquée dans le retour des importines- α au cytoplasme (Kutay *et al.* 1997; Faustino *et al.* 2008). Il serait donc intéressant de vérifier si l'impact du stade amastigote de *L. donovani* sur l'import nucléaire de STAT1 α par l'importine- α 5 découle de la synthèse de céramide.

4.4. Relargage de facteurs modulatoires par les cellules infectées

Les cellules infectées par un agent pathogène relarguent parfois des cytokines, des vésicules ou d'autres composantes d'origine cellulaire ou microbienne qui exercent alors un effet de proximité (« bystander ») activateur ou inhibiteur sur les cellules avoisinantes. Par exemple, les cellules épithéliales infectées par la bactérie *E. coli* entérohémorragique (EHEC) sécrètent un facteur non protéique et résistant à la chaleur capable d'inhiber la phosphorylation de STAT1 en réponse à l'IFN- γ (Jandu *et al.* 2006). Il semble toutefois que l'infection de macrophages par le stade amastigote de *L. donovani* n'engendre pas la sécrétion de facteurs (cellulaires ou parasitaires) ayant un effet inhibiteur sur les réponses à l'IFN- γ , car l'expression de IRF-1 en réponse à l'IFN- γ se produit normalement chez les macrophages non infectés mis en contact avec du surnageant de macrophages infectés par des amastigotes de *L. donovani*.

De toute évidence, de plus amples études devront être effectuées afin d'éclaircir le mécanisme par lequel les amastigotes de *L. donovani* inhibent l'interaction de STAT1 α avec l'importine- α 5 et ainsi l'expression génique induite par l'IFN- γ . La caractérisation de ce mécanisme permettra peut-être en outre d'obtenir une meilleure compréhension des événements qui régulent l'interaction STAT1 α -importine- α 5.

5. Mécanisme de phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷

L'analyse des voies de signalisation intracellulaire en situation d'infection permet parfois d'éclaircir les processus qui les gouvernent. Les résultats de ce projet ont apporté quelques précisions sur la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ . Tel que mentionné, l'importance de cet évènement de phosphorylation pour l'induction des réponses transcriptionnelles de l'IFN- γ est bien connue, mais nos connaissances sur les mécanismes qui le régissent sont en revanche très limitées et les études portant sur ce sujet offrent souvent des conclusions contradictoires.

Par exemple, les opinions divergent quant à la dépendance de la phosphorylation du résidu S⁷²⁷ de STAT1 α sur celle du résidu Y⁷⁰¹. La corrélation entre ces évènements est controversée chez les fibroblastes : certaines études suggèrent que la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ requiert celle du résidu Y⁷⁰¹ (Kovarik *et al.* 2001), alors que d'autres études indiquent qu'elle en est indépendante (Zhu *et al.* 1997). Chez le macrophage, aucun lien de dépendance n'a été établi à ce jour, malgré que la majorité des molécules de STAT1 α phosphorylées sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ soient également phosphorylées sur Y⁷⁰¹ (Kovarik *et al.* 1998). L'identité du compartiment intracellulaire dans lequel est effectuée la phosphorylation des STATs sur sérine demeure également énigmatique. Une étude récente exécutée sur des fibroblastes embryonnaires de souris a proposé que la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ se produise dans le compartiment nucléaire, suite à la phosphorylation préalable de STAT1 α sur le résidu Y⁷⁰¹, son import au noyau et son association stable à la chromatine (Sadzak *et al.* 2008).

Nos résultats indiquent que le niveau maximal de phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ survient alors que STAT1 α est déjà phosphorylé sur Y⁷⁰¹ et que le processus de translocation nucléaire a été entamé (Fig. 3 et 5 de l'article). Un tel délai des cinétiques, aussi observé par d'autres équipes (Zhu *et al.* 1997), ne signifie toutefois pas nécessairement qu'il existe un lien de dépendance entre la phosphorylation de S⁷²⁷ et la phosphorylation de Y⁷⁰¹ ainsi que l'import nucléaire de STAT1. Il est

possible que la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ soit simplement une réponse un peu plus tardive de l'IFN- γ destinée à amplifier l'expression génique déjà en cours. D'ailleurs, l'infection de macrophages par les amastigotes de *L. donovani* engendre une inhibition de la translocation nucléaire de STAT1 α induite par l'IFN- γ sans toutefois affecter sa phosphorylation sur S⁷²⁷. Cette observation suggère que la phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ chez les macrophages soit indépendante de sa translocation nucléaire et se produise plutôt dans le cytoplasme. De plus amples analyses seraient toutefois nécessaires afin de confirmer cette hypothèse et de vérifier la dépendance potentielle de la phosphorylation du résidu S⁷²⁷ sur celle du résidu Y⁷⁰¹.

6. Applications thérapeutiques

L'incapacité de l'hôte à établir une réponse immunitaire adaptative efficace contre *Leishmania* contribue à la survie intracellulaire du parasite et la progression de la maladie (Solbach et Laskay 2000). Il est donc primordial que les traitements développés contre la leishmaniose stimulent les propriétés antimicrobiennes du macrophage et la réponse des lymphocytes Th1. Bien que ce ne soit pas son mode d'action principal contre *Leishmania* (Murray et Delph-Etienne 2000), la miltéfosine active par exemple plusieurs fonctions impliquées dans la destruction des agents pathogènes et dans l'activation des lymphocytes Th1. En effet, ce médicament stimulate entre autres la flambée oxydative, la production de NO, l'expression du CMH II et la sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α par les macrophages et les monocytes (Hochhuth *et al.* 1992; Beckers, Voegeli et Hilgard 1994; Eue, Zeisig et Arndt 1995; Zeisig *et al.* 1995). Ces effets découlent d'une stimulation de plusieurs voies de signalisation, incluant la cascade JAK-STAT1 (Wadhone *et al.* 2009).

L'identification des facteurs parasitaires et cellulaires impliqués dans l'inhibition des réponses à l'IFN- γ chez le macrophage par le stade amastigote de *L. donovani* mettra peut-être en évidence des nouvelles cibles intéressantes pour le développement de traitements prophylactiques ou thérapeutiques contre la leishmaniose.

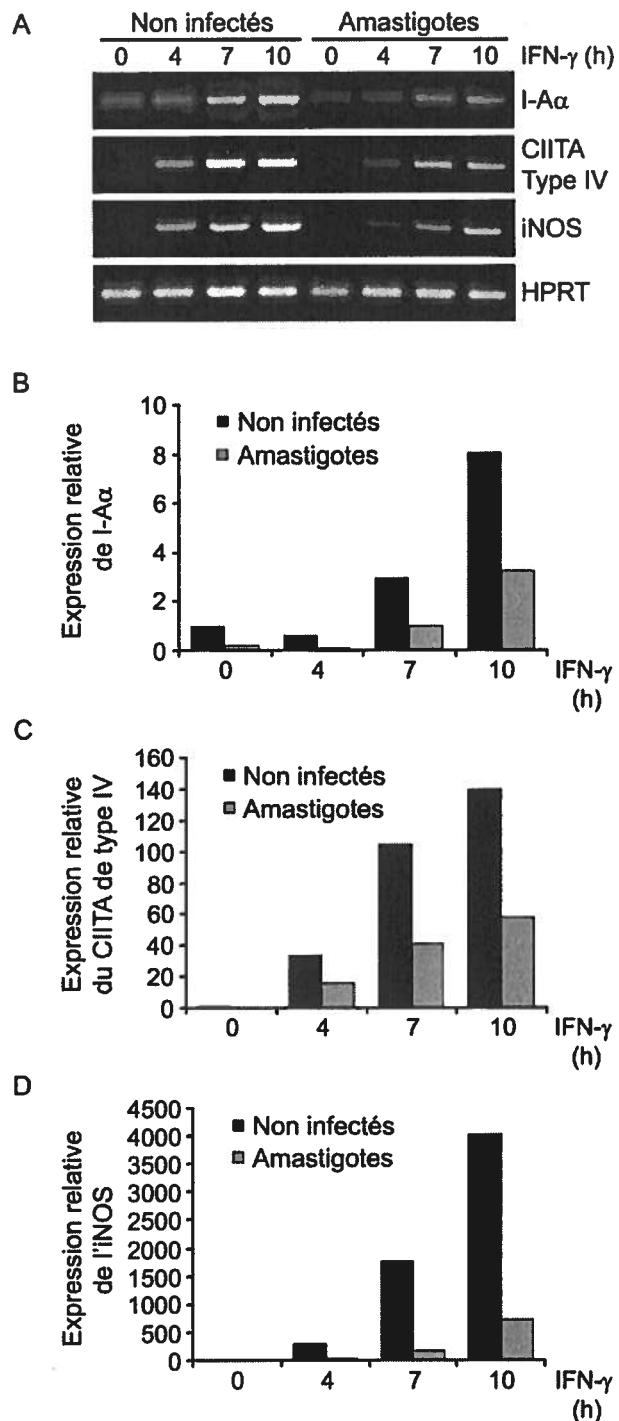
CONCLUSION

En somme, les résultats obtenus dans le cadre de ce projet ont permis d'acquérir une meilleure compréhension des stratégies exploitées par le protozoaire *Leishmania* afin d'empêcher l'activation des fonctions antimicrobiennes du macrophage et ainsi assurer sa survie intracellulaire. Nous démontrons que le stade amastigote de l'espèce *L. donovani* altère la signalisation via la cascade JAK-STAT1 en réponse à l'IFN- γ spécifiquement au niveau de l'interaction de STAT1 α avec l'importine- $\alpha 5$, l'adaptateur d'import nucléaire impliqué dans la translocation de STAT1 α au noyau en réponse à l'IFN- γ . De cette façon, les amastigotes empêchent l'expression de IRF-1 et ainsi la transcription des gènes codant pour le CMH II, le CIITA et l'iNOS induite par l'IFN- γ . La spécificité de l'effet du stade amastigote de *L. donovani* sur la signalisation de l'IFN- γ via la voie JAK-STAT1 et, de ce fait, l'activation des fonctions du macrophage contraste avec l'impact généralisé du stade promastigote de nombreuses espèces de *Leishmania*.

Le système d'infection de macrophages par le stade amastigote de *L. donovani* a également permis d'éclaircir le mécanisme de phosphorylation de STAT1 α sur S⁷²⁷ en réponse à l'IFN- γ chez les macrophages, et facilitera peut-être l'approfondissement de nos connaissances sur les processus qui gouvernent l'interaction STAT1 α -importine- $\alpha 5$ induite par l'IFN- γ . Enfin, nous espérons que l'identification éventuelle des composantes cellulaires et parasitaires impliquées dans l'inhibition des réponses à l'IFN- γ par le stade amastigote de *L. donovani* mettra en évidence de nouvelles cibles intéressantes pour le développement de traitements prophylactiques ou thérapeutiques contre la leishmaniose viscérale.

APPENDICE A

Confirmation de l'impact des amastigotes de *L. donovani* sur l'expression génique induite par l'IFN- γ par la technique de qPCR

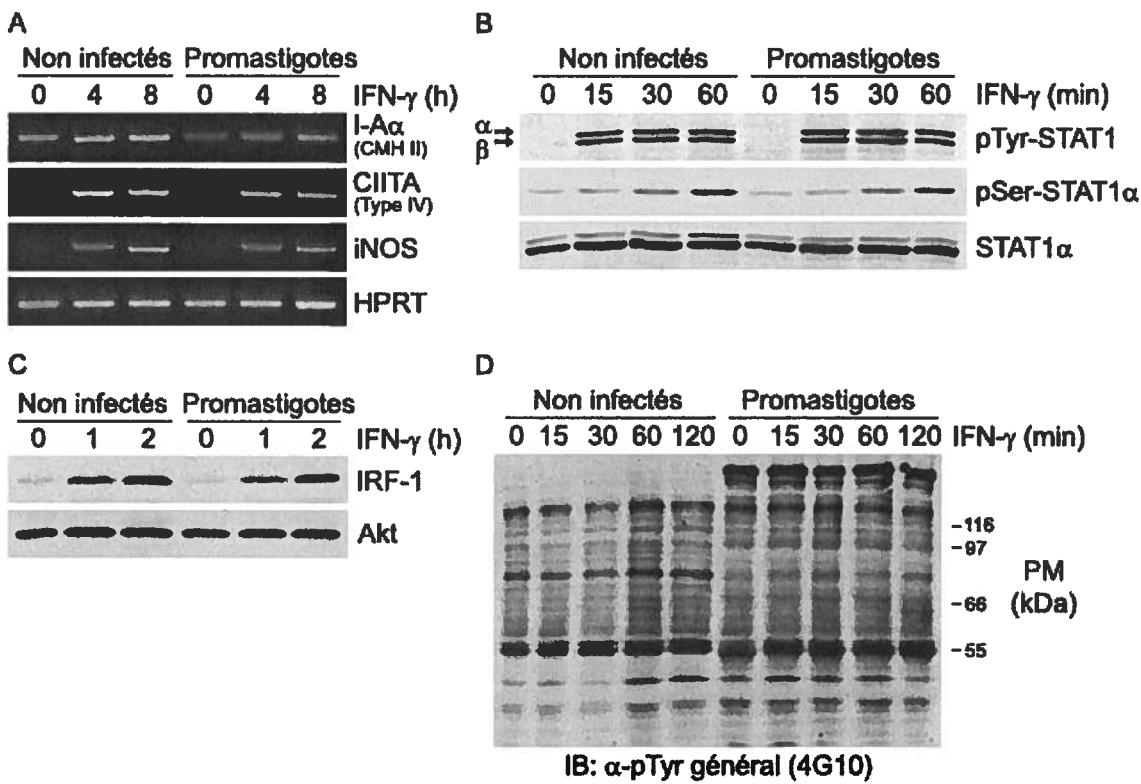


Légende: Des BMM de souris Balb/c ont été incubés à 37 °C pendant 18h en absence ou en présence d'amastigotes spléniques de *L. donovani* LV9, à un ratio parasite:BMM de 20:1. Suite à un sevrage en sérum de 2h, les BMM ont été stimulés à l'IFN- γ (100 U/mL) selon les temps indiqués. L'ARN total des BMM a été extrait, rétrotranscrit (RT), puis

analysé par PCR tel que décrit dans l'article (A), ou par qPCR pour l'expression de I-A α (B), du CIITA de type IV (C), de l'iNOS (D), ainsi que du gène témoin Hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT). L'amplification par qPCR a été effectuée dans un volume final de 20 μ L, contenant 10 μ L du tampon PerfeCTa SYBR Green SuperMix Low ROX reagent (Quanta Biosciences, Inc., Gaithersburg, MD, USA), 7 μ L d'eau de qualité pour chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) autoclavée (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada), 2 μ L d'ADN complémentaire (ADNc), et 500 nM des amores suivantes: pour I-A α , 5'-TCA GTC GCA GAC GGT GTT TAT-3' (sens) and 5'-GGG GGC TGG AAT CTC AGG T-3' (antisens); pour CIITA de type IV, 5'-GAG ACT GCA TGC AGG CAG CA-3' (sens) and 5'-GGT CGG CAT CAC TGT TAA GGA-3' (antisens); pour iNOS, 5'-CAG CAC AGG AAA TGT TTC AGC-3' (sens) and 5'-TAG CCA GCG TAC CGG ATG A-3' (antisens); et pour HPRT, 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3' (sens) and 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C-3' (antisens). Les réactions de qPCR ont été effectuées en dupliques sur une machine MX3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) sous les conditions suivantes: une étape de dénaturation initiale de 10 min à 95°C, 40 cycles de 95°C 10 s, 60°C 15 s et 72°C 20 s, suivis d'une étape finale de courbe de dissociation permettant de vérifier qu'un seul pic d'amplification (spécifique au gène) n'était produit par paire d'amores. Les valeurs de cycle seuil (Ct) ont été enregistrées avec le programme MxPro-Mx3000P v3.20 Build 340 Schema 74, normalisées selon celles de HPRT et analysées par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen 2001).

APPENDICE B

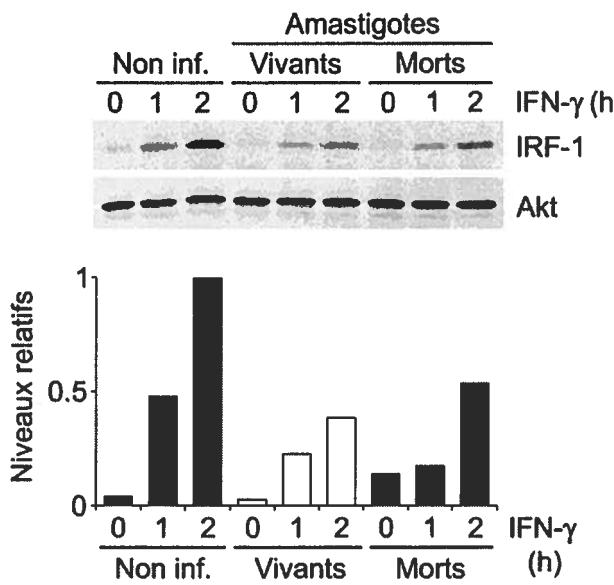
Impact du stade promastigote de *L. donovani* sur les réponses à l'IFN- γ
et la signalisation via la voie JAK-STAT1



Légende: Des BMM de souris Balb/c ont été incubés à 37 °C pendant 6h en absence ou en présence de promastigotes de *L. donovani* LV9 (dérivés d'amastigotes spléniques) en phase stationnaire, à un ratio parasite:BMM de 20:1. Suite à un sevrage en sérum de 2h, les BMM ont été stimulés à l'IFN- γ (100 U/mL) selon les temps indiqués. (A) L'ARN total des BMM a été extrait et analysé par RT-PCR pour l'expression de I-A α , du CIITA de type IV, de l'iNOS et de HPRT. (B-D) Les extraits totaux des BMM ont été analysés par immunobuvardage (IB) pour l'expression de IRF-1, pTyr-STAT1, pSer-STAT1 α et STAT1 α , ou avec l'anti-phosphotyrosine général (4G10). PM : Poids moléculaire.

APPENDICE C

**La viabilité des amastigotes de *L. donovani* n'est pas essentielle
à l'inhibition des réponses à l'IFN- γ par ce stade du parasite**



Légende: Des BMM de souris Balb/c ont été incubés à 37 °C pendant 18h en absence ou en présence d'amastigotes spléniques de *L. donovani* LV9, vivants ou fixés à la formaline 0.1% (morts), à un ratio parasite:BMM de 20:1. Suite à un sevrage en sérum de 2h, les BMM ont été stimulés à l'IFN- γ (100 U/mL) selon les temps indiqués. Les extraits totaux ont été analysés par immunobuvardage pour l'expression de IRF-1 (la protéine Akt sert ici de témoin pour la normalisation de l'expression de IRF-1). L'analyse densitométrique de l'expression de IRF-1, représentée en termes de niveaux relatifs par rapport à l'échantillon non infecté et stimulé à l'IFN- γ pendant 2h, a été effectuée pour une expérience représentative de trois expériences indépendantes.

RÉFÉRENCES

- Accolla, R. S., et al. 2001. The MHC class II transactivator: prey and hunter in infectious diseases. *Trends Immunol* 22 (10):560-3.
- Alvarez, G. R., B. S. Zwilling, et W. P. Lafuse. 2003. *Mycobacterium avium* inhibition of IFN-gamma signaling in mouse macrophages: Toll-like receptor 2 stimulation increases expression of dominant-negative STAT1 beta by mRNA stabilization. *J Immunol* 171 (12):6766-73.
- Antoine, J. C., et al. 1999. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci* 112 (Pt 15):2559-70.
- Antoine, J. C., et al. 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun* 58 (3):779-87.
- Antoine, J. C., et al. 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 6 (10):392-401.
- Assreuy, J., et al. 1994. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 24 (3):672-6.
- Bach, E. A., M. Aguet, et R. D. Schreiber. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563-91.
- Bach, E. A., et al. 1996. Ligand-induced assembly and activation of the gamma interferon receptor in intact cells. *Mol Cell Biol* 16 (6):3214-21.
- Balestieri, F. M., et al. 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect* 4 (1):23-9.

- Banninger, G., et N. C. Reich. 2004. STAT2 nuclear trafficking. *J Biol Chem* 279 (38):39199-206.
- Banuls, A. L., M. Hide, et F. Prugnolle. 2007. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64:1-109.
- Baron, M., et J. L. Davignon. 2008. Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol* 181 (8):5530-6.
- Barriosuevo, P., et al. 2001. Immune complexes (IC) down-regulate the basal and interferon-gamma-induced expression of MHC class II on human monocytes. *Clin Exp Immunol* 125 (2):251-7.
- Barriosuevo, P., et al. 2003. Immune complex-FcgammaR interaction modulates monocyte/macrophage molecules involved in inflammation and immune response. *Clin Exp Immunol* 133 (2):200-7.
- Beckers, T., R. Voegeli, et P. Hilgard. 1994. Molecular and cellular effects of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in human myeloid leukaemic cell lines. *Eur J Cancer* 30A (14):2143-50.
- Belkaid, Y., B. Butcher, et D. L. Sacks. 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* 28 (4):1389-400.
- Bennett, C. L., et al. 2001. Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 31 (3):876-83.
- Bernabei, P., et al. 2001. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. *J Leukoc Biol* 70 (6):950-60.

- Bertholet, S., et al. 2003. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. *Infect Immun* 71 (4):2095-101.
- Best, S. M., et al. 2005. Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J Virol* 79 (20):12828-39.
- Bhardwaj, N., et al. 2005. *Leishmania* inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by *Leishmania mexicana*. *Int J Parasitol* 35 (1):75-82.
- Bhattacharya, S. K., et al. 2007. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 196 (4):591-8.
- Blanchette, J., et al. 1999. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. *Eur J Immunol* 29 (11):3737-44.
- Blos, M., et al. 2003. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur J Immunol* 33 (5):1224-34.
- Boehm, U., et al. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749-95.
- Boekhoudt, G. H., M. R. Frazier-Jessen, et G. M. Feldman. 2007. Immune complexes suppress IFN-gamma signaling by activation of the FcgammaRI pathway. *J Leukoc Biol* 81 (4):1086-92.
- Bogdan, C., et M. Rollinghoff. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol* 28 (1):121-34.

- Bouhet, S., et al. 2009. The IFNgamma-induced STAT1-CBP/P300 association, required for a normal response to the cytokine, is disrupted in *Brucella*-infected macrophages. *Microb Pathog* 46 (2):88-97.
- Brierley, M. M., et E. N. Fish. 2005. Stats: multifaceted regulators of transcription. *J Interferon Cytokine Res* 25 (12):733-44.
- Briscoe, J., et al. 1996. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state. *EMBO J* 15 (4):799-809.
- Buchmeier, N. A., et R. D. Schreiber. 1985. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (21):7404-8.
- Buchmüller-Rouiller, Y., et J. Mauël. 1987. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infect Immun* 55 (3):587-93.
- Carrera, L., et al. 1996. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 183 (2):515-26.
- Ceponis, P. J., et al. 2003. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 disrupts Stat1-mediated gamma interferon signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* 71 (3):1396-404.
- Chakraborty, D., et al. 2005. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. *J Immunol* 175 (5):3214-24.
- Chang, C. H., et R. A. Flavell. 1995. Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med* 181 (2):765-7.
- Chappuis, F., et al. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5 (11):873-82.

- Charest, H., et G. Matlashewski. 1994. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* 14 (5):2975-84.
- Chatti, K., W. L. Farrar, et R. J. Duhe. 2004. Tyrosine phosphorylation of the Janus kinase 2 activation loop is essential for a high-activity catalytic state but dispensable for a basal catalytic state. *Biochemistry* 43 (14):4272-83.
- Cheng, S. M., et al. 2009. HIV-1 transactivator protein induction of suppressor of cytokine signaling-2 contributes to dysregulation of IFN{gamma} signaling. *Blood* 113 (21):5192-201.
- Chook, Y. M., et G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11 (6):703-15.
- Choudhury, G. G. 2004. A linear signal transduction pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase Cepsilon, and MAPK in mesangial cells regulates interferon-gamma-induced STAT1alpha transcriptional activation. *J Biol Chem* 279 (26):27399-409.
- Conti, E., et al. 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* 94 (2):193-204.
- Courret, N., et al. 1999. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. *Eur J Immunol* 29 (3):762-73.
- Croker, B. A., H. Kiu, et S. E. Nicholson. 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19 (4):414-22.
- De Almeida, M. C., S. A. Cardoso, et M. Barral-Netto. 2003. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 33 (2):153-62.

- De Souza Leao, S., et al. 1995. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 10):3219-31.
- Deb, D. K., et al. 2003. Activation of protein kinase C delta by IFN-gamma. *J Immunol* 171 (1):267-73.
- Decker, T., et P. Kovarik. 2000. Serine phosphorylation of STATs. *Oncogene* 19 (21):2628-37.
- Dermine, J. F., et al. 2005. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. *Cell Microbiol* 7 (9):1263-70.
- Dermine, J. F., et al. 2000. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol* 2 (2):115-26.
- Descoteaux, A., et G. Matlashewski. 1989. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol Cell Biol* 9 (11):5223-7.
- Descoteaux, A., et S. J. Turco. 2002. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect* 4 (9):975-81.
- Descoteaux, A., et al. 1991. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol* 146 (8):2747-53.
- Desjardins, M., et A. Descoteaux. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* 185 (12):2061-8.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27 (5):305-18.

- Dey, R., et al. 2007. *Leishmania donovani*-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase Czeta and phosphatase. *Infect Immun* 75 (5):2136-42.
- Didcock, L., et al. 1999. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J Virol* 73 (12):9928-33.
- Dogra, N., C. Warburton, et W. R. McMaster. 2007. *Leishmania major* abrogates gamma interferon-induced gene expression in human macrophages from a global perspective. *Infect Immun* 75 (7):3506-15.
- Durbin, J. E., et al. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84 (3):443-50.
- Eisemann, J., et al. 2007. Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 interferes with the interferon signaling pathway. *Immunobiology* 212 (9-10):877-86.
- Endo, T. A., et al. 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387 (6636):921-4.
- Eue, I., R. Zeisig, et D. Arndt. 1995. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U 937 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 121 (6):350-6.
- Ezekowitz, R. A., S. H. Orkin, et P. E. Newburger. 1987. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J Clin Invest* 80 (4):1009-16.
- Fagerlund, R., et al. 2002. Arginine/lysine-rich nuclear localization signals mediate interactions between dimeric STATs and importin alpha 5. *J Biol Chem* 277 (33):30072-8.

- Faustino, R. S., et al. 2008. Ceramide regulation of nuclear protein import. *J Lipid Res* 49 (3):654-62.
- Feldman, G. M., E. J. Chuang, et D. S. Finbloom. 1995. IgG immune complexes inhibit IFN-gamma-induced transcription of the Fc gamma RI gene in human monocytes by preventing the tyrosine phosphorylation of the p91 (Stat1) transcription factor. *J Immunol* 154 (1):318-25.
- Feng, J., et al. 1997. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol* 17 (5):2497-501.
- Fontes, M. R., T. Teh, et B. Kobe. 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* 297 (5):1183-94.
- Forget, G., D. J. Gregory, et M. Olivier. 2005. Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 280 (34):30542-9.
- Forget, G., et al. 2006. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun* 74 (11):6272-9.
- Forget, G., et al. 2001. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. *Eur J Immunol* 31 (11):3185-96.
- Frieman, M., et al. 2007. Severe acute respiratory syndrome coronavirus ORF6 antagonizes STAT1 function by sequestering nuclear import factors on the rough endoplasmic reticulum/Golgi membrane. *J Virol* 81 (18):9812-24.
- Fruth, U., N. Solioz, et J. A. Louis. 1993. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J Immunol* 150 (5):1857-64.

- Garcin, D., J. Curran, et D. Kolakofsky. 2000. Sendai virus C proteins must interact directly with cellular components to interfere with interferon action. *J Virol* 74 (19):8823-30.
- Gauzzi, M. C., et al. 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem* 271 (34):20494-500.
- Ghosh, S., et al. 2001. Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. *Mol Cell Biochem* 223 (1-2):47-60.
- Ghosh, S., et al. 2002. *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infect Immun* 70 (12):6828-38.
- Gil, M. P., et al. 2001. Biologic consequences of Stat1-independent IFN signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12):6680-5.
- Giroux, M. 2004. Étude des mécanismes par lesquels la PKC-alpha module l'inflammation et la présentation antigénique chez le macrophage murin. Thèse de doctorat, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval.
- Görlich, D., et al. 1996. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J* 15 (20):5584-94.
- Görlich, D., et al. 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* 377 (6546):246-8.
- Green, S. J., et al. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* 144 (1):278-83.

- Greenlund, A. C., et al. 1994. Ligand-induced IFN gamma receptor tyrosine phosphorylation couples the receptor to its signal transduction system (p91). *EMBO J* 13 (7):1591-600.
- Greenlund, A. C., et al. 1995. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity* 2 (6):677-87.
- Greenlund, A. C., et al. 1993. Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J Biol Chem* 268 (24):18103-10.
- Gregory, D. J., et M. Olivier. 2005. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology* 130 Suppl:S27-35.
- Guy, R. A., et M. Belosevic. 1993. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun* 61 (4):1553-8.
- Harada, H., et al. 1989. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. *Cell* 58 (4):729-39.
- Harada, H., et al. 1994. Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol Cell Biol* 14 (2):1500-9.
- Hardy, P.-O., et al. 2009. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of protein kinase C-alpha activation in interferon-gamma-stimulated macrophages. *Immunology*.
- Haspel, R. L., et J. E. Darnell, Jr. 1999. A nuclear protein tyrosine phosphatase is required for the inactivation of Stat1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (18):10188-93.
- Haspel, R. L., M. Salditt-Georgieff, et J. E. Darnell, Jr. 1996. The rapid inactivation of nuclear tyrosine phosphorylated Stat1 depends upon a protein tyrosine phosphatase. *EMBO J* 15 (22):6262-8.

- Heim, M. H., et al. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267 (5202):1347-9.
- Hemmi, S., et al. 1994. A novel member of the interferon receptor family complements functionality of the murine interferon gamma receptor in human cells. *Cell* 76 (5):803-10.
- Hochhuth, C. H., et al. 1992. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. *Cell Immunol* 141 (1):161-8.
- Holm, A., et al. 2003. Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 302 (4):653-8.
- Holm, A., et al. 2001. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* 3 (7):439-47.
- Horvath, C. M., et J. E. Darnell, Jr. 1996. The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *J Virol* 70 (1):647-50.
- Huang, S., et al. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259 (5102):1742-5.
- Hussain, A., et al. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation. *J Virol* 82 (2):893-902.
- Hussain, S., B. S. Zwilling, et W. P. Lafuse. 1999. *Mycobacterium avium* infection of mouse macrophages inhibits IFN-gamma Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN-gamma receptor. *J Immunol* 163 (4):2041-8.

- Ihle, J. N. 1995. The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Semin Immunol* 7 (4):247-54.
- Isaacs, A., et J. Lindenmann. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147 (927):258-67.
- Jandu, N., et al. 2006. Conditioned medium from enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected T84 cells inhibits signal transducer and activator of transcription 1 activation by gamma interferon. *Infect Immun* 74 (3):1809-18.
- Jiao, H., et al. 1996. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 16 (12):6985-92.
- Jouanguy, E., et al. 1999. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet* 21 (4):370-8.
- Kamijo, R., et al. 1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263 (5153):1612-5.
- Kaplan, D. H., et al. 1996. Identification of an interferon-gamma receptor alpha chain sequence required for JAK-1 binding. *J Biol Chem* 271 (1):9-12.
- Kaye, P. M., et al. 1994. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol* 24 (11):2850-4.
- Kima, P. E. 2007. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol* 37 (10):1087-96.
- Kima, P. E., et al. 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191 (6):1063-8.

- Kima, P. E., et al. 1996. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 26 (12):3163-9.
- Kota, R. S., et al. 2006. Regulation of gene expression in RAW 264.7 macrophage cell line by interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 342 (4):1137-46.
- Kotenko, S. V., et al. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4 (1):69-77.
- Kotenko, S. V., et al. 1995. Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem* 270 (36):20915-21.
- Kovarik, P., et al. 2001. Specificity of signaling by STAT1 depends on SH2 and C-terminal domains that regulate Ser727 phosphorylation, differentially affecting specific target gene expression. *EMBO J* 20 (1-2):91-100.
- Kovarik, P., et al. 1998. Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J* 17 (13):3660-8.
- Krause, C. D., et al. 2006. Preassembly and ligand-induced restructuring of the chains of the IFN-gamma receptor complex: the roles of Jak kinases, Stat1 and the receptor chains. *Cell Res* 16 (1):55-69.
- Krause, C. D., et al. 2002. Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Mol Cell Proteomics* 1 (10):805-15.
- Krebs, D. L., et D. J. Hilton. 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19 (5):378-87.
- Kutay, U., et al. 1997. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90 (6):1061-71.

- Kwan, W. C., et al. 1992. Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. *Infect Immun* 60 (5):2115-20.
- Kwon, M. J., et al. 2007. Role of PKCdelta in IFN-gamma-inducible CIITA gene expression. *Mol Immunol* 44 (11):2841-9.
- Lang, T., et al. 1994. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J Cell Sci* 107 (Pt 8):2137-50.
- LeibundGut-Landmann, S., et al. 2004. Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34 (6):1513-25.
- Leonard, W. J., et J. J. O'Shea. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16:293-322.
- Levy, D. E., et J. E. Darnell, Jr. 2002. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (9):651-62.
- Liew, F. Y., et al. 1991. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Eur J Immunol* 21 (12):3009-14.
- Liew, F. Y., et al. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 144 (12):4794-7.
- Lim, C. P., et X. Cao. 2006. Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Mol Biosyst* 2 (11):536-50.
- Lin, W., et al. 2005. Hepatitis C virus expression suppresses interferon signaling by degrading STAT1. *Gastroenterology* 128 (4):1034-41.

- Liu, B., et al. 2001. A transcriptional corepressor of Stat1 with an essential LXXLL signature motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (6):3203-7.
- Liu, B., et al. 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (18):10626-31.
- Liu, B., et al. 2004. PIAS1 selectively inhibits interferon-inducible genes and is important in innate immunity. *Nat Immunol* 5 (9):891-8.
- Liu, K. D., et al. 1997. Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation. *Curr Biol* 7 (11):817-26.
- Liu, L., K. M. McBride, et N. C. Reich. 2005. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (23):8150-5.
- Livak, K. J., et T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-8.
- Lodge, R., et A. Descoteaux. 2005a. *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. *Cell Microbiol* 7 (11):1647-58.
- Lodge, R., et A. Descoteaux. 2005b. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* 114 (3):256-65.
- Lodge, R., et A. Descoteaux. 2006. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. *Eur J Immunol* 36 (10):2735-44.
- Lodge, R., T. O. Diallo, et A. Descoteaux. 2006. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol* 8 (12):1922-31.

- Lohoff, M., et al. 1997. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response *in vivo*. *Immunity* 6 (6):681-9.
- Lüder, C. G., et al. 2001. *Toxoplasma gondii* down-regulates MHC class II gene expression and antigen presentation by murine macrophages via interference with nuclear translocation of STAT1alpha. *Eur J Immunol* 31 (5):1475-84.
- Ma, J., et X. Cao. 2006. Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal* 18 (8):1117-26.
- Macara, I. G. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* 65 (4):570-94, table of contents.
- MacMicking, J., Q. W. Xie, et C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-50.
- Marg, A., et al. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins Nup153 and Nup214 and CRM1-dependent nuclear export control the subcellular distribution of latent Stat1. *J Cell Biol* 165 (6):823-33.
- Marsters, S. A., et al. 1995. Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (12):5401-5.
- Martin, E., C. Nathan, et Q. W. Xie. 1994. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 180 (3):977-84.
- Masternak, K., et al. 2000. CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 14 (9):1156-66.
- Mazzi, P., et al. 2004. IFN-gamma induces gp91phox expression in human monocytes via protein kinase C-dependent phosphorylation of PU.1. *J Immunol* 172 (8):4941-7.

- McBride, K. M., et al. 2002. Regulated nuclear import of the STAT1 transcription factor by direct binding of importin-alpha. *EMBO J* 21 (7):1754-63.
- McBride, K. M., C. McDonald, et N. C. Reich. 2000. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor. *EMBO J* 19 (22):6196-206.
- McConville, M. J., et J. M. Blackwell. 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem* 266 (23):15170-9.
- Medina-Acosta, E., et al. 1989. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol* 37 (2):263-73.
- Meier, C. L., M. Svensson, et P. M. Kaye. 2003. *Leishmania*-induced inhibition of macrophage antigen presentation analyzed at the single-cell level. *J Immunol* 171 (12):6706-13.
- Melby, P. C., et al. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166 (3):1912-20.
- Melén, K., et al. 2003. Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278 (30):28193-200.
- Melén, K., L. Kinnunen, et I. Julkunen. 2001. Arginine/lysine-rich structural element is involved in interferon-induced nuclear import of STATs. *J Biol Chem* 276 (19):16447-55.
- Meraz, M. A., et al. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84 (3):431-42.

- Mertens, C., et al. 2006. Dephosphorylation of phosphotyrosine on STAT1 dimers requires extensive spatial reorientation of the monomers facilitated by the N-terminal domain. *Genes Dev* 20 (24):3372-81.
- Meyer, T., et al. 2002. Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *EMBO J* 21 (3):344-54.
- Meyer, T., et al. 2003. DNA binding controls inactivation and nuclear accumulation of the transcription factor Stat1. *Genes Dev* 17 (16):1992-2005.
- Meyer, T., et U. Vinkemeier. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transcription factors. *Eur J Biochem* 271 (23-24):4606-12.
- Mo, W., et al. 2008. Nuclear beta-arrestin1 functions as a scaffold for the dephosphorylation of STAT1 and moderates the antiviral activity of IFN-gamma. *Mol Cell* 31 (5):695-707.
- Mosser, D. M., et P. J. Edelson. 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 135 (4):2785-9.
- Mosser, D. M., et P. J. Edelson. 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327 (6120):329-31.
- Mosser, D. M., et L. A. Rosenthal. 1993. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* 4 (5):315-22.
- Muhlethaler-Mottet, A., et al. 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8 (2):157-66.
- Mukbel, R. M., et al. 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg* 76 (4):669-75.

Mukhopadhyay, S., et C. Mandal. 2006. Glycobiology of *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res* 123 (3):203-20.

Mukkada, A. J., et al. 1985. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. *Science* 229 (4718):1099-101.

Müller, M., et al. 1993. The protein tyrosine kinase JAK1 complements defects in interferon-alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature* 366 (6451):129-35.

Murray, H. W., et S. Delph-Etienne. 2000. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J Infect Dis* 181 (2):795-9.

Murray, H. W., et C. F. Nathan. 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189 (4):741-6.

Nair, J. S., et al. 2002. Requirement of Ca²⁺ and CaMKII for Stat1 Ser-727 phosphorylation in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (9):5971-6.

Nandan, D., R. Lo, et N. E. Reiner. 1999. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 67 (8):4055-63.

Nandan, D., et N. E. Reiner. 1995. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infect Immun* 63 (11):4495-500.

Nandan, D., et N. E. Reiner. 2005. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clin Immunol* 114 (3):266-77.

- Nandan, D., et al. 2002. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J Biol Chem* 277 (51):50190-7.
- Nelson, N., et al. 1993. Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* 13 (1):588-99.
- Newburger, P. E., et al. 1988. Induction of phagocyte cytochrome b heavy chain gene expression by interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (14):5215-9.
- Nguyen, H., et al. 2001. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem* 276 (36):33361-8.
- Olivier, M., K. G. Baimbridge, et N. E. Reiner. 1992. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. *J Immunol* 148 (4):1188-96.
- Olivier, M., R. W. Brownsey, et N. E. Reiner. 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (16):7481-5.
- Olivier, M., D. J. Gregory, et G. Forget. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18 (2):293-305.
- Olivier, M., et al. 1998. Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression. *J Biol Chem* 273 (22):13944-9.
- Pai, R. K., et al. 2002. Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J Immunol* 169 (3):1326-33.

- Parsa, K. V., et al. 2008. *Francisella* gains a survival advantage within mononuclear phagocytes by suppressing the host IFNgamma response. *Mol Immunol* 45 (12):3428-37.
- Paulnock-King, D., et al. 1985. Coordinate induction of Ia alpha, beta, and II mRNA in a macrophage cell line. *J Immunol* 135 (1):632-6.
- Pham, N. K., J. Mouriz, et P. E. Kima. 2005. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. *Infect Immun* 73 (12):8322-33.
- Pimenta, P. F., E. M. Saraiva, et D. L. Sacks. 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol* 72 (2):191-204.
- Pine, R., A. Canova, et C. Schindler. 1994. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the ISGF2/IRF-1 promoter to mediate induction by IFN alpha and IFN gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *EMBO J* 13 (1):158-67.
- Platanias, L. C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5 (5):375-86.
- Platanias, L. C., et E. N. Fish. 1999. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* 27 (11):1583-92.
- Prina, E., et al. 1993. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol* 151 (4):2050-61.
- Prina, E., et al. 1996. Presentation of the protective parasite antigen LACK by *Leishmania*-infected macrophages. *J Immunol* 156 (11):4318-27.
- Privé, C., et A. Descoteaux. 2000. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur J Immunol* 30 (8):2235-44.

- Proudfoot, L., C. A. O'Donnell, et F. Y. Liew. 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol* 25 (3):745-50.
- Qadoumi, M., et al. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70 (8):4638-42.
- Radi, R., et al. 1991a. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288 (2):481-7.
- Radi, R., et al. 1991b. Peroxynitrite oxidation of sulphydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266 (7):4244-50.
- Ramana, C. V., et al. 2001. Stat1-independent regulation of gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12):6674-9.
- Ramana, C. V., et al. 2002. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol* 23 (2):96-101.
- Rane, S. G., et E. P. Reddy. 2000. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* 19 (49):5662-79.
- Ray, M., et al. 2000. Inhibition of interferon-gamma signaling by *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 181 (3):1121-8.
- Regis, G., et al. 2006. IFNgammaR2 trafficking tunes IFNgamma-STAT1 signaling in T lymphocytes. *Trends Immunol* 27 (2):96-101.
- Reich, N. C. 2007. STAT dynamics. *Cytokine Growth Factor Rev* 18 (5-6):511-8.
- Reich, N. C., et L. Liu. 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat Rev Immunol* 6 (8):602-12.
- Reid, S. P., et al. 2006. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha1 and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol* 80 (11):5156-67.

- Reid, S. P., et al. 2007. Ebola virus VP24 proteins inhibit the interaction of NPI-1 subfamily karyopherin alpha proteins with activated STAT1. *J Virol* 81 (24):13469-77.
- Reiner, N. E. 1987. Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*. *J Immunol* 138 (6):1919-25.
- Reiner, N. E., et al. 1988. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (12):4330-4.
- Reiner, N. E., W. Ng, et W. R. McMaster. 1987. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 138 (6):1926-32.
- Reiner, N. E., et al. 1990. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania donovani*. Interferon-gamma prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1. *J Clin Invest* 85 (6):1914-24.
- Revest, M., et al. 2008. Comparison of the immunomodulatory effects of *L. donovani* and *L. major* excreted-secreted antigens, particulate and soluble extracts and viable parasites on human dendritic cells. *Vaccine* 26 (48):6119-23.
- Rodgers, W., et K. Smith. 2005. Properties of glycolipid-enriched membrane rafts in antigen presentation. *Crit Rev Immunol* 25 (1):19-30.
- Rodriguez, N. E., H. K. Chang, et M. E. Wilson. 2004. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect Immun* 72 (4):2111-22.

- Rosas, L. E., et al. 2003. Development of protective immunity against cutaneous leishmaniasis is dependent on STAT1-mediated IFN signaling pathway. *Eur J Immunol* 33 (7):1799-805.
- Roth, K. M., et al. 2009. *Francisella* inhibits STAT1-mediated signaling in macrophages and prevents activation of antigen-specific T cells. *Int Immunol* 21 (1):19-28.
- Rothfuchs, A. G., et al. 2006. STAT1 regulates IFN-alpha beta- and IFN-gamma-dependent control of infection with Chlamydia pneumoniae by nonhemopoietic cells. *J Immunol* 176 (11):6982-90.
- Sacks, D., et N. Noben-Trauth. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2 (11):845-58.
- Sadzak, I., et al. 2008. Recruitment of Stat1 to chromatin is required for interferon-induced serine phosphorylation of Stat1 transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (26):8944-9.
- Saha, B., et al. 1995. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 25 (9):2492-8.
- Saito, K., et al. 2008. Hepatitis C virus inhibits cell surface expression of HLA-DR, prevents dendritic cell maturation, and induces interleukin-10 production. *J Virol* 82 (7):3320-8.
- Sakatsume, M., et al. 1995. The Jak kinases differentially associate with the alpha and beta (accessory factor) chains of the interferon gamma receptor to form a functional receptor unit capable of activating STAT transcription factors. *J Biol Chem* 270 (29):17528-34.
- Salman, S. M., N. G. Rubeiz, et A. G. Kibbi. 1999. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. *Clin Dermatol* 17 (3):291-6.

- Sasaki, A., et al. 1999. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4 (6):339-51.
- Schneider, P., et al. 1992. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol* 75 (2):196-206.
- Schroder, K., et al. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75 (2):163-89.
- Scianimanico, S., et al. 1999. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. *Cell Microbiol* 1 (1):19-32.
- Sekimoto, T., et al. 1997. Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J* 16 (23):7067-77.
- Sekimoto, T., et al. 1996. Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J Biol Chem* 271 (49):31017-20.
- Senft, A. P., et al. 2009. RSV Impairs Macrophage IFN-{alpha}/{beta}- and IFN-{gamma}-Stimulated Transcription by Distinct Mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol.*
- Shuai, K. 2003. Serine phosphorylation: arming Stat1 against infection. *Immunity* 19 (6):771-2.
- Shuai, K., et al. 1994. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76 (5):821-8.
- Shuai, K., J. Liao, et M. M. Song. 1996. Enhancement of antiproliferative activity of gamma interferon by the specific inhibition of tyrosine dephosphorylation of Stat1. *Mol Cell Biol* 16 (9):4932-41.

- Shuai, K., et B. Liu. 2003. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 3 (11):900-11.
- Silverman, J. M., et al. 2008. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol* 9 (2):R35.
- Simmons, J. D., et al. 2009. Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff. *J Virol* 83 (20):10571-81.
- Solbach, W., et T. Laskay. 2000. The host response to *Leishmania* infection. *Adv Immunol* 74:275-317.
- Späth, G. F., et al. 2009. A novel role for Stat1 in phagosome acidification and natural host resistance to intracellular infection by *Leishmania major*. *PLoS Pathog* 5 (4):e1000381.
- Spilianakis, C., et al. 2003. CIITA regulates transcription onset via Ser5-phosphorylation of RNA Pol II. *EMBO J* 22 (19):5125-36.
- Stark, G. R., et al. 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-64.
- Stoiber, D., et al. 2001. *Listeria monocytogenes* modulates macrophage cytokine responses through STAT serine phosphorylation and the induction of suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* 166 (1):466-72.
- Strehlow, I., et C. Schindler. 1998. Amino-terminal signal transducer and activator of transcription (STAT) domains regulate nuclear translocation and STAT deactivation. *J Biol Chem* 273 (43):28049-56.
- Subramaniam, P. S., B. A. Torres, et H. M. Johnson. 2001. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* 15 (4):175-87.

- Sundar, S., et al. 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* 356 (25):2571-81.
- Sundar, S., et al. 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis* 31 (4):1104-7.
- Suzuki, K., et al. 2000. Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice. *Int Immunol* 12 (2):123-32.
- Suzuki, Y., et al. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240 (4851):516-8.
- Taniguchi, T., M. S. Lamphier, et N. Tanaka. 1997. IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1333 (1):M9-17.
- ten Hoeve, J., et al. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 22 (16):5662-8.
- Ting, J. P., et J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109 Suppl:S21-33.
- Ting, L. M., et al. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol* 163 (7):3898-906.
- Turco, S. J., et D. L. Sacks. 1991. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 45 (1):91-9.
- van Boxel-Dezaire, A. H., et G. R. Stark. 2007. Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma. *Curr Top Microbiol Immunol* 316:119-54.
- Varinou, L., et al. 2003. Phosphorylation of the Stat1 transactivation domain is required for full-fledged IFN-gamma-dependent innate immunity. *Immunity* 19 (6):793-802.

- Velazquez, L., et al. 1992. A protein tyrosine kinase in the interferon alpha/beta signaling pathway. *Cell* 70 (2):313-22.
- Vidy, A., et al. 2007. The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1. *J Virol* 81 (8):4255-63.
- Vila-del Sol, V., C. Punzón, et M. Fresno. 2008. IFN-gamma-induced TNF-alpha expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. *J Immunol* 181 (7):4461-70.
- Vinet, A. F., et al. 2009. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. *PLoS Pathog* 5 (10):e1000628.
- Vinkemeier, U., et al. 1996. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J* 15 (20):5616-26.
- Visconti, R., et al. 2000. Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity. *Blood* 96 (5):1844-52.
- Wadhone, P., et al. 2009. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol* 182 (11):7146-54.
- Waldburger, J. M., et al. 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 194 (4):393-406.
- Watling, D., et al. 1993. Complementation by the protein tyrosine kinase JAK2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature* 366 (6451):166-70.

- Wei, X. Q., et al. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375 (6530):408-11.
- Weinheber, N., et al. 1998. Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur J Immunol* 28 (8):2467-77.
- Wen, Z., Z. Zhong, et J. E. Darnell, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82 (2):241-50.
- Wilks, A. F., et al. 1991. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 11 (4):2057-65.
- Winberg, M. E., et al. 2009. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect* 11 (2):215-22.
- Xin, L., K. Li, et L. Soong. 2008. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol* 45 (12):3371-82.
- Xiong, H., et al. 2003. Complex formation of the interferon (IFN) consensus sequence-binding protein with IRF-1 is essential for murine macrophage IFN-gamma-induced iNOS gene expression. *J Biol Chem* 278 (4):2271-7.
- Xu, D., et C. K. Qu. 2008. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci* 13:4925-32.
- Yang, E., et al. 1999. The linker domain of Stat1 is required for gamma interferon-driven transcription. *Mol Cell Biol* 19 (7):5106-12.
- Yasukawa, H., et al. 1999. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 18 (5):1309-20.

- Yokosawa, N., *et al.* 2002. C-terminal region of STAT1alpha is not necessary for its ubiquitination and degradation caused by mumps virus V protein. *J Virol* 76 (24):12683-90.
- Young, H. A. 1996. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 16 (8):563-8.
- Zakharova, N., *et al.* 2003. Distinct transcriptional activation functions of STAT1alpha and STAT1beta on DNA and chromatin templates. *J Biol Chem* 278 (44):43067-73.
- Zeisig, R., *et al.* 1995. Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 121 (2):69-75.
- Zhang, J. J., *et al.* 1996a. Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (26):15092-6.
- Zhang, W. W., *et al.* 1996b. Identification and overexpression of the A2 amastigote-specific protein in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 78 (1-2):79-90.
- Zhu, X. S., *et al.* 2000. Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol* 20 (16):6051-61.
- Zhu, X., *et al.* 1997. Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol* 17 (11):6618-23.
- Zimmermann, S., *et al.* 2006. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. *J Immunol* 176 (3):1840-7.